

REC'D 04 SEP 2000 10/069290

WIPC 22.08.00

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

JPC 2000-038689

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

2000年 2月16日

4

出 願 番 号

Application Number:

特願2000-038689

出 願 人

Applicant (s):

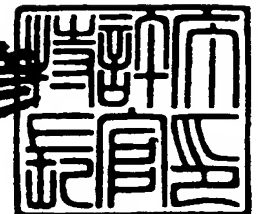
中外製薬株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 6月29日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特2000-3052482

【書類名】 特許願

【整理番号】 1003117

【提出日】 平成12年 2月16日

【あて先】 特許庁長官 近藤 隆彦 殿

【国際特許分類】 A61K 38/18
A61K 39/00

【発明の名称】 HM 1 . 2 4 抗原の発現増強剤

【請求項の数】 20

【発明者】

 【住所又は居所】 徳島県徳島市八万町千鳥 1 1 - 1 0

 【氏名】 小阪 昌明

【発明者】

 【住所又は居所】 徳島県徳島市南庄町 3 丁目 8

 【氏名】 尾崎 修治

【発明者】

 【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会
社内

 【氏名】 若原 裕二

【特許出願人】

 【識別番号】 000003311

 【氏名又は名称】 中外製薬株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100077517

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 石田 敬

 【電話番号】 03-5470-1900

【選任した代理人】

 【識別番号】 100092624

 【弁理士】

【氏名又は名称】 鶴田 準一

【選任した代理人】

【識別番号】 100087871

【弁理士】

【氏名又は名称】 福本 積

【選任した代理人】

【識別番号】 100082898

【弁理士】

【氏名又は名称】 西山 雅也

【選任した代理人】

【識別番号】 100081330

【弁理士】

【氏名又は名称】 樋口 外治

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成11年特許願第236007号

【出願日】 平成11年 8月23日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 036135

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9814920

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 HM1.24抗原の発現増強剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 インターフェロン α またはインターフェロン γ を有効成分とする、配列番号：2に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質（HM1.24抗原）の骨髓腫細胞における発現増強剤。

【請求項 2】 有効成分として、

(1) インターフェロン α またはインターフェロン γ および

(2) 配列番号：2に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質に特異的に結合し、かつ細胞傷害活性を有する抗体、

を含んで成る骨髓腫の治療剤。

【請求項 3】 骨髓腫が多発性骨髓腫である請求項 2に記載の治療剤。

【請求項 4】 抗体がモノクローナル抗体である請求項 2または3に記載の治療剤。

【請求項 5】 抗体が細胞傷害活性を有する抗体である請求項 4に記載の治療剤。

【請求項 6】 抗体がキメラまたはヒト型化抗体である請求項 2に記載の治療剤。

【請求項 7】 抗体が抗HM1.24抗体である請求項 5に記載の治療剤。

【請求項 8】 キメラまたはヒト型化抗体が、キメラ抗HM1.24抗体またはヒト型化抗HM1.24抗体である請求項 6に記載の治療剤。

【請求項 9】 IRF-2蛋白質を有効成分とする、配列番号：2に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質（HM1.24抗原）の骨髓腫細胞における発現増強剤。

【請求項 10】 IRF-2蛋白質を有効成分とするHM1.24プロモーターの活性化剤。

【請求項 11】 有効成分として、

(1) IRF-2蛋白質および

(2) 配列番号：2に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質に特異的に結合し、かつ細胞傷害活性を有する抗体、

を含んで成る骨髓腫の治療剤。

【請求項 1 2】 骨髓腫が多発性骨髓腫である請求項11に記載の治療剤。

【請求項 1 3】 抗体がモノクローナル抗体である請求項11または12に記載の治療剤。

【請求項 1 4】 抗体が細胞傷害活性を有する抗体である請求項13に記載の治療剤。

【請求項 1 5】 抗体がキメラまたはヒト型化抗体である請求項11に記載の治療剤。

【請求項 1 6】 抗体が抗HM1.24抗体である請求項14に記載の治療剤。

【請求項 1 7】 キメラまたはヒト型化抗体が、キメラ抗HM1.24抗体またはヒト型化抗HM1.24抗体である請求項15に記載の治療剤。

【請求項 1 8】 IRF-2 蛋白質の発現を増強する化合物を有効成分として含有するHM1.24抗原の骨髓種細胞における発現増強剤。

【請求項 1 9】 IRF-2 蛋白質の発現を増強する化合物を有効成分として含有するHM1.24プロモーターの活性化剤。

【請求項 2 0】 HM1.24抗原の発現増強剤をスクリーニングする方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、骨髓腫におけるHM1.24抗原の発現増強剤としてのインターフェロン α 及びインターフェロン γ 並びに IRF-2蛋白質の使用に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

骨髓腫 (myeloma) は、形質細胞種 (plasmacytoma)、多発性骨髓腫 (multiple myeloma) とも呼ばれ、モノクローナルな形質細胞の骨髓内集積を特徴とする腫瘍性疾患である。骨髓腫は、免疫グロブリンを産生し分泌する終末分化B細胞、すなわち形質細胞がモノクローナルに主として骨髓において増加する疾患で、この疾患の患者の血清中にはモノクローナルな免疫グロブリンもしくはその構成成分であるL鎖、H鎖などが検出される。

骨髓腫の治療としては、これまで化学療法剤等が使用されているが、骨髓腫を完全寛解に導き、骨髓腫患者の生存期間を延長するような有効な治療剤は見いだされておらず、骨髓腫の治療効果を有する薬剤の登場が待たれていた。

【0003】

一方、Goto, T.らは、ヒト骨髓腫細胞をマウスに免疫して得られたモノクローナル抗体（マウス抗HM1.24抗体）を報告している（Blood (1994) 84, 1922-1930）。ヒト骨髓腫細胞を移植したマウスに抗HM1.24抗体を投与すると、この抗体が腫瘍組織に特異的に集積したこと（小阪昌明ら、日本臨床（1995）53, 627-635）から、抗HM1.24抗体はラジオアイソトープ標識による腫瘍局在の診断や、ラジオイムノセラピーなどのミサイル療法に応用することが可能であることが示唆されている。

【0004】

また、上記Blood (1994) 84, 1922-1930には、抗HM1.24抗体が、in vitroにおいて、ヒト骨髓腫細胞株RPMI8226に対して細胞傷害活性を有することが述べられている。また、マウス抗HM1.24抗体をキメラ化したキメラ抗HM1.24抗体、およびヒト型化した再構成抗HM1.24抗体が、骨髓腫細胞に特異的に結合すること、さらには細胞傷害活性を有することが示されている（Blood (1999) 93, 3922-3930）。

【0005】

このように、HM1.24抗原は、終末分化B細胞である骨髓腫細胞に特異的に高発現しており、この抗原を認識する抗HM1.24抗体は、細胞表面のHM1.24分子数に比例して殺細胞活性を発揮することから、抗HM1.24抗体を用いた免疫療法は多発性骨髓腫に有効な治療法と考えられる。従って、抗HM1.24抗体の抗原であるHM1.24抗原の細胞表面上の発現量を増強することができれば、より少量の抗体投与により同等の細胞傷害活性が期待でき、副作用をより低下させることが可能となる。

【0006】

一方、ウイルス増殖抑制活性を示す物質として発見されたインターフェロンは、現在、ほ乳類においては、 α 、 β 、 γ 及び ω の4種類に分類され、多彩な生理活性を有することが知られている（Pestka, S., et.al., Ann.Rev.Biochem. (19

87) 56, 727-777; Langer, J.A., et.al., Immunology Today (1988) 9, 393-400)。しかしながら、インターフェロン α およびインターフェロン γ が、骨髓腫細胞において、HM1.24抗原の発現量を増加させる作用を有することについては報告がなかった。

【0007】

他方、インターフェロン調節因子(interferon regulatory factor)(IRF)-1 および2は、IFN- β 遺伝子の転写調節因子として同定された。IRF-1 および2は一般に同じ遺伝子制御配列に結合し、IRE-1 は転写活性化因子、IRF-2 は転写抑制因子として拮抗的に作用することが知られている。IRF-2 を高発現させたNIH3T3細胞は細胞飽和密度の上昇、メチルセルロースゲルでのコロニー形成、ヌードマウスでの造腫瘍性が認められ、IRF-2 は癌遺伝子として機能することが明らかになっている。

【0008】

一方、最近の研究の進展により、IRF-2 が細胞周期の調節に働くヒストンH4の発現に必要であることが示されている。また、IRF-2 は筋肉細胞においてvascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)の発現を上昇させることが示され、VCAM-1の活性化にはIRF-2 の酸性領域(182 から218)が作用していることも明らかになっている。このことからIRF-2 は転写抑制因子として働くばかりでなく、転写活性化因子として作用を示す場合も知られている。

しかしながら、IRF-2蛋白質がHM1.24抗原遺伝子のプロモーター(HM1.24プロモーター)に結合し、該プロモーターを活性化することは知られていなかった。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

現在行われている骨髓腫の治療は、上記のごとく、未だ完全ではなく、骨髓腫を完全寛解に導き、患者の生存期間を延長させる画期的な治療剤あるいは治療法が待たれている。抗HM1.24抗体による骨髓腫の治療は、特異性及び有効性の点で画期的な治療剤となる可能性があり、抗HM1.24抗体の作用をより効果的に発揮させる方法が望まれている。

従って、本発明の目的は、骨髓腫細胞において、HM1.24抗原の発現量を増加さ

せることで、抗HM1.24抗体の骨髓腫抑制作用を増強させる手段を提供することである。

【0010】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、かかる方法を提供すべく、HM1.24抗原の発現量を増加させる薬剤を探索した結果、インターフェロン α およびインターフェロン γ が所望の活性を有することを見出し、本発明を完成するに至った。

従って本発明は、インターフェロン α またはインターフェロン γ を有効成分とする、配列番号：2に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質（HM1.24抗原）の骨髓腫細胞における発現の増強剤を提供する。

【0011】

本発明はまた、有効成分として、

（１）インターフェロン α またはインターフェロン γ 、及び

（２）配列番号：2に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質に特異的に結合し、且つ細胞傷害活性を有する抗体、
を含んで成る、骨髓腫の治療剤を提供する。

上記の骨髓腫として典型的なものは多発性骨髓腫である。

前記抗体は、好ましくはモノクローナル抗体、キメラ抗体又はヒト型化抗体であり、好ましくは細胞傷害活性を有するものである。

【0012】

本発明者らはまたHM1.24プロモーターの活性化剤を探索した結果、IRF-2蛋白質が所望の活性を有することを見出し、本発明を完成するに至った。

従って本発明は、IRF-2蛋白質を有効成分とする、配列番号：2に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質（HM1.24抗原）の骨髓腫細胞における発現の増強剤を提供する。

本発明はまた、IRF-2蛋白質を有効成分とするHM1.24プロモーターの活性化剤を提供する。

【0013】

本発明はまた、有効成分として、

(1) IRF-2蛋白質、及び

(2) 配列番号：2に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質に特異的に結合し、且つ細胞傷害活性を有する抗体、
を含んで成る、骨髓腫の治療剤を提供する。

上記の骨髓腫として典型的なものは多発性骨髓腫である。

前記抗体は、好ましくはモノクローナル抗体、キメラ抗体又はヒト型化抗体であり、好ましくは細胞傷害活性を有するものである。

【0014】

本発明はまた、IRF-2蛋白質の発現を増強する化合物を有効成分として含有するHM1.24抗原の骨髓種細胞における発現増強剤を提供する。

本発明はまた、IRF-2蛋白質の発現を増強する化合物を有効成分として含有するHM1.24プロモーターの活性化剤を提供する。

本発明はさらに、HM1.24抗原の発現増強剤をスクリーニングする方法を提供する。

【0015】

【発明の実施の形態】

インターフェロン α 及びインターフェロン γ

本発明で使用されるインターフェロン α 及びインターフェロン γ は、HM1.24抗原の発現量を増加させる活性を有する限り変異体を用いることも可能である。HM1.24抗原の発現量を測定するには、実施例に記載されたように、骨髓腫細胞株あるいは骨髓腫患者から採取した骨髓腫細胞を用いて、フローサイトメトリーにより検出することができる。変異体としては、例えば、1もしくは数個、あるいは複数個のアミノ酸残基が、欠失または置換または挿入または付加等により変異されたインターフェロン α 及びインターフェロン γ であってもよい。

【0016】

欠失または置換または挿入を蛋白に導入する方法としては、対応する遺伝子を改変する部位特異的変異誘発法を用いることができる (Hashimoto-Gotoh, Gene (1995) 152, 271-275, Zoller, Methods Enzymol. (1983) 100, 468-500, Kramer, Nucleic Acids Res. (1984) 12, 9441-8456, Kunkel, Proc.Natl.Acad.Sci.

USA (1985) 82, 488-492、「新細胞工学実験プロトコール 東京大学医科学研究所 制癌研究部編 (1993) p241-248」)。

【0017】

また、市販のPCRを利用した「部位特異的変異誘発システム (GIBCO-BRL)」や「QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit」(ストラタジーン社製)を利用することも可能である。また、蛋白質中のアミノ酸の変異は自然界においても生じることもある。また、この様に変異を導入された蛋白がもとの蛋白と同様の活性を有することは、Mark, Proc.Natl.Acad.Sci. USA (1984) 81, 5662-5666に示されている。

【0018】

アミノ酸残基の置換においては、性質の保存されたアミノ酸どうしで置換することが好ましい。例えば、疎水性アミノ酸 (A, I, L, M, F, P, W, Y, V)、親水性アミノ酸 (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T)、脂肪族側鎖を有するアミノ酸 (G, A, V, L, I, P)、水酸基含有側鎖を有するアミノ酸 (S, T, Y)、硫黄原子含有側鎖を有するアミノ酸 (C, M)、カルボン酸及びアミド含有側鎖を有するアミノ酸 (D, N, E, Q)、塩基含有側鎖を有するアミノ酸 (R, K, H)、芳香族含有側鎖を有するアミノ酸 (H, F, Y, W) どうしの置換が好ましい。

【0019】

さらに、変異体としては、インターフェロン α 又はインターフェロン γ のペプチド断片を用いることも可能である。特に、インターフェロン α 又はインターフェロン γ 受容体との結合部位を有するペプチド断片が好ましい。好ましくは100個以上、さらに好ましくは130個以上、さらに好ましくは150個、最も好ましくは160個以上の連続するアミノ酸残基から構成されるペプチド断片である。

【0020】

IRF-2蛋白質

インターフェロン調節因子(interferon regulatory factor)(IRF)-1 および2はIFN- β 遺伝子の転写調節因子として同定された。IRF-1 および2は一般に同じ

遺伝子制御配列に結合し、IRE-1 は転写活性化因子、IRF-2 は転写抑制因子として拮抗的に作用することが知られている。IRF-2 を高発現させたNIH3T3細胞は細胞飽和密度の上昇、メチルセルロースゲルでのコロニー形成、ヌードマウスでの造腫瘍性が認められ、IRF-2 は癌遺伝子として機能することが明らかになっている。

【0021】

一方、最近の研究の進展により、IRF-2 が細胞周期の調節に働くヒストンH4の発現に必要であることが示されている。また、IRF-2 は筋肉細胞においてvascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)の発現を上昇させることが示され、VCAM-1の活性化にはIRF-2 の酸性領域(182 から218)が作用していることも明らかになっている。このことからIRF-2 は転写抑制因子として働くばかりでなく、転写活性化因子として作用を示す場合も知られている。

【0022】

ハイブリドーマ

本発明で使用される抗体を産生するハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、HM1.24抗原蛋白質やHM1.24抗原を発現する細胞を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

【0023】

具体的には、モノクローナル抗体を作製するには次のようにすればよい。例えば、抗体取得の感作抗原であるHM1.24抗原発現細胞としては、ヒト多発性骨髄腫細胞株であるKPM2 (特開平7-236475)やKPC-32 (Goto, T. et al., Jpn.J.Clin.Hematol. (1991) 32, 1400)を用いることができる。また、感作抗原として配列番号1に示すアミノ酸配列を有する蛋白質、あるいは抗HM1.24抗体が認識するエピトープを含むペプチドまたはポリペプチドを使用することができる。

【0024】

なお、感作抗原として使用される、配列番号1に示すアミノ酸配列を有する蛋

白質のcDNAはpUC19 ベクターのXbaI切断部位の間に挿入されて、プラスミドpRS38-pUC19 として調製されている。このプラスミドpRS38-pUC19 を含む大腸菌(*E. coli*) は、平成5年(1993年)10月5日付で工業技術院生命工学工業技術研究所に、*Escherichia coli* DH5 α (pRS38-pUC19) として、受託番号FERM BP-4434としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている(特開平7-196694参照)。このプラスミドpRS38-pUC19 に含まれるcDNA断片を用いて遺伝子工学的手法により、抗HM1.24抗体が認識するエピトープを含むペプチドまたはポリペプチドを作製することができる。

【0025】

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的にはげっ歯類の動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター等が使用される。

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。例えば、一般的方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内または、皮下に注射することにより行われる。

【0026】

具体的には、感作抗原をPBS (Phosphate-Buffered Saline) や生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものを所望により通常のアジュバント、例えば、フロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に4~21日毎に数回投与するのが好ましい。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することができる。

このように免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞が取り出され、細胞融合に付される。細胞融合に付される好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が挙げられる。

【0027】

前記免疫細胞と融合される他方の親細胞としての哺乳動物のミエローマ細胞は、すでに、公知の種々の細胞株、例えば、P3X63Ag8.653 (*J. Immunol.* (1979) 123: 1548-1550), P3X63Ag8U.1 (*Current Topics in Microbiology and Immunology* (1978) 81: 1-7), NS-1 (Kohler, G. and Milstein, C. *Eur. J. Immunol.* (19

76) 6: 511-519) , MPC-11 (Margulies.D.H.et al., Cell (1976) 8: 405-415) , SP2/0 (Shulman, M. et al., Nature (1978) 276: 269-270) , F0 (de St.Groth, S.F. et al., J.Immunol.Methods (1980) 35: 1-21) , S194 (Trowbridge , I.S.J.Exp.Med. (1978) 148: 313-323) , R210 (Galfre, G. et al., Nature (1979) 277: 131-133) 等が適宜使用される。

【 0 0 2 8 】

前記免疫細胞とミエローマ細胞の細胞融合は基本的には公知の方法、たとえば、ミルステインらの方法 (Kohler.G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73: 3-46) 等に準じて行うことができる。

より具体的には、前記細胞融合は例えば、細胞融合促進剤の存在下に通常の栄養培養液中で実施される。融合促進剤としては例えば、ポリエチレングリコール (P E G) 、 センダイウィルス (HVJ) 等が使用され、更に所望により融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を添加使用することもできる。

【 0 0 2 9 】

免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は、例えば、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を 1 ~ 1 0 倍とするのが好ましい。前記細胞融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適なRPMI1640培養液、MEM 培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用可能であり、さらに、牛胎児血清(FCS) 等の血清補液を併用することもできる。

【 0 0 3 0 】

細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培養液中でよく混合し、予め、3 7℃程度に加温したPEG 溶液、例えば、平均分子量1000-6000程度のPEG 溶液を通常、3 0 ~ 6 0 % (w / v) の濃度で添加し、混合することによって目的とする融合細胞 (ハイブリドーマ) が形成される。続いて、適当な培養液を逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等を除去できる。

【 0 0 3 1 】

当該ハイブリドーマは、通常の選択培養液、例えば、HAT 培養液 (ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液) で培養することにより選択

される。当該HAT 培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間、通常数日～数週間継続する。ついで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよび単一クローニングが行われる。

【 0 0 3 2 】

また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球をin vitroでHM1.24抗原またはHM1.24抗原発現細胞で感作し、感作リンパ球をヒトミエローマ細胞、例えばU266と融合させ、HM1.24抗原またはHM1.24抗原発現細胞への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる（特公平1-59878 参照）。さらに、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原となるHM1.24抗原またはHM1.24抗原発現細胞を投与し、前述の方法に従い所望のヒト抗体を取得してもよい（国際特許出願公開番号W093/12227, W092/03918, W094/02602, W094/25585, W096/34096, W096/33735参照）。

【 0 0 3 3 】

このようにして作製されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の培養液中で継代培養することが可能であり、また、液体窒素中で長期保存することが可能である。

当該ハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得するには、当該ハイブリドーマを通常の方法にしたがい培養し、その培養上清として得る方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法などが採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、一方、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。

【 0 0 3 4 】

モノクローナル抗体

具体的には、抗HM1.24抗体産生ハイブリドーマの作製は、Goto, T.らの方法（Blood (1994) 84, 1922-1930）により行うことができる。工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、平成7年9月14日にFERM BP-5233としてブダペスト条約に基づき国際寄託された抗HM1.24抗体産生ハイブリドーマをBALB/cマウス（日本クレア製）の腹腔内に注入して腹水を得、この

腹水から抗HM1.24抗体を精製する方法や、本ハイブリドーマを適当な培地、例えば、10%ウシ胎児血清、5% BM-CondimedH1 (Boehringer Mannheim 製) 含有 RPMI1640培地、ハイブリドーマSFM 培地 (GIBCO-BRL 製)、PFHM-II培地 (GIBCO-BRL 製) 等で培養し、その培養上清から抗HM1.24抗体を精製する方法で行うことができる。

【0035】

組換え型抗体

本発明では、モノクローナル抗体として、抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体を用いることができる (例えば、Carl, A.K.Borrebaeck, James, W.Larrick, THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990参照)。

【0036】

具体的には、目的とする抗体を産生するハイブリドーマから、抗体の可変 (V) 領域をコードする mRNA を単離する。mRNA の単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法 (Chirgwin, J.M.ら、Biochemistry (1979) 18, 5294-5299)、AGPC法 (Chmczynski, P.ら、(1987) 162, 156-159) 等により全RNA を調製し、mRNA Purification Kit (Pharmacia製) 等を使用して mRNA を調製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia製) を用いることにより mRNA を直接調製することができる。

【0037】

得られた mRNA から逆転写酵素を用いて抗体 V 領域の cDNA を合成する。cDNA の合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit 等を用いて行うことができる。また、cDNA の合成および増幅を行うには 5' -Ampli FINDE R RACE Kit (Clontech製) および PCR を用いた 5' -RACE 法 (Frohman, M.A. ら、Proc.Natl.Acad.Sci. USA (1988) 85, 8998-9002; Belyavsky, A. ら、Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932) を使用することができる。得られた PCR 産物から目的とする DNA 断片を精製し、ベクター DNA と連結する。さらに、これより組換えベクターを作成し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組

換えベクターを調製する。目的とするDNA の塩基配列を公知の方法、例えば、ジデオキシ法により確認する。

【0038】

目的とする抗体のV領域をコードするDNA が得られれば、これを所望の抗体定常領域（C領域）をコードするDNA と連結し、これを発現ベクターへ組み込む。または、抗体のV領域をコードするDNA を、抗体C領域のDNA を含む発現ベクターへ組み込んでよい。

本発明で使用する抗体を製造するには、後述のように抗体遺伝子を発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させることができる。

【0039】

改変抗体

本発明では、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ（Chimeric）抗体、ヒト型化（Humanized）抗体などを使用できる。これらの改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。

キメラ抗体は、前記のようにして得た抗体V領域をコードするDNA をヒト抗体C領域をコードするDNA と連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得られる（欧州特許出願公開番号EP 125023、国際特許出願公開番号W096/02576参照）。この既知の方法を用いて、本発明に有用なキメラ抗体を得ることができる。

【0040】

例えば、キメラ抗HM1.24抗体のL鎖およびH鎖を含むプラスミドを有する大腸菌は、各々Escherichia coli DH5 α （pUC19-1.24L-g κ ）およびEscherichia coli DH5 α （pUC19-1.24H-g γ 1）として、工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、平成8年8月29日に、各々FERM BP-5646およびFERM BP-5644としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている（特願平8-264756参照）。

【0041】

ヒト型化抗体は、再構成 (reshaped) ヒト抗体とも称され、ヒト以外の哺乳動物、たとえばマウス抗体の相補性決定領域 (CDR ; complementarity determining region) をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている (欧州特許出願公開番号 EP 125023 、国際特許出願公開番号 W096/02576 参照)。

【0042】

具体的には、マウス抗体の CDR とヒト抗体のフレームワーク領域 (framework-region ; FR) を連結するように設計した DNA 配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドから PCR 法により合成する。得られた DNA をヒト抗体 C 領域をコードする DNA と連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることにより得られる (欧州特許出願公開番号 EP 239400 、国際特許出願公開番号 W096/02576 参照)。

【0043】

CDR を介して連結されるヒト抗体の FR は、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい (Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856)。

例えば、ヒト型化抗 HM1.24 抗体の L 鎖および H 鎖を含むプラスミドを有する大腸菌は、各々 *Escherichia coli* DH5 α (pUC19-RVLa-AHM-gk) および *Escherichia coli* DH5 α (pUC19-RVHr-AHM-g γ 1) として、工業技術院生命工学工業技術研究所

(茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号) に、平成 8 年 8 月 29 日に、各々 FERM BP-5645 および FERM BP-5643 としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている (特願平 8-264756 参照)。

【0044】

キメラ抗体、ヒト型化抗体には、ヒト抗体 C 領域が使用され、細胞傷害活性を呈するヒト抗体 C 領域として、ヒト C γ 例えば、C γ 1, C γ 2, C γ 3, C γ 4 を使用することができる。これらのうち、特に C γ 1, C γ 3 を有する抗体が強力な細

胞傷害活性、すなわち、ADCC活性、CDC 活性を有し、本発明に好適に使用される。

【0045】

キメラ抗体はヒト以外の哺乳動物由来抗体の可変領域とヒト抗体由来のC領域からなり、ヒト型化抗体はヒト以外の哺乳動物由来抗体の相補性決定領域とヒト抗体由来のフレームワーク領域 (framework region; FR) およびC領域からなり、ヒト体内における抗原性が低下しているため、本発明の治療剤の有効成分として有用である。

本発明に使用されるヒト型化抗体の好ましい具体例としては、ヒト型化抗HM1.24抗体が挙げられる (特願平8-264756参照)。

【0046】

発現および産生

前記のように構築した抗体遺伝子は、公知の方法により発現させ、取得することができる。哺乳類細胞の場合、常用される有用なプロモーター、発現される抗体遺伝子、その3'側下流にポリAシグナルを機能的に結合させたDNAあるいはそれを含むベクターにより発現させることができる。例えばプロモーター/エンハンサーとしては、ヒトサイトメガロウィルス前期プロモーター/エンハンサー (human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer) を挙げることもできる。

【0047】

また、その他に本発明で使用される抗体発現に使用できるプロモーター/エンハンサーとして、レトロウィルス、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、シミアンウィルス40 (SV40) 等のウィルスプロモーター/エンハンサーやヒトエロエンゲーションファクター1 α (HEF1 α) などの哺乳類細胞由来のプロモーター/エンハンサーを用いればよい。

例えば、SV40プロモーター/エンハンサーを使用する場合、Mulliganらの方法 (Nature (1979) 277, 108)、また、HEF1 α プロモーター/エンハンサーを使用する場合、Mizushima らの方法 (Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322) に従えば容易に実施することができる。

【0048】

大腸菌の場合、常用される有用なプロモーター、抗体分泌のためのシグナル配列、発現させる抗体遺伝子を機能的に結合させて発現させることができる。例えばプロモーターとしては、lacZプロモーター、araBプロモーターを挙げることができる。lacZプロモーターを使用する場合、Wardらの方法 (Nature (1098) 341, 544-546; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427)、araBプロモーターを使用する場合、Betterらの方法 (Science (1988) 240, 1041-1043) に従えばよい。

【0049】

抗体分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelBシグナル配列 (Lei, S.P. et al J.Bacteriol. (1987) 169, 4379) を使用すればよい。ペリプラズムに産生された抗体を分離した後、抗体の構造を適切にリフォールド (refold) して使用する (例えば、W096/30394を参照)。

【0050】

複製起源としては、SV40、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ウシパピローマウイルス (BPV) 等の由来のものを用いることができ、さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドトランスフェラーゼ (APH) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌キサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogpt) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 遺伝子等を含むことができる。

本発明で使用される抗体の製造のために、任意の産生系を使用することができる。抗体製造のための産生系は、in vitroおよびin vivoの産生系がある。in vitroの産生系としては、真核細胞を使用する産生系や原核細胞を使用する産生系が挙げられる。

【0051】

真核細胞を使用する場合、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を用いる産生系がある。動物細胞としては、(1) 哺乳類細胞、例えば、CHO、COS、ミエローマ、BHK (baby hamster kidney)、HeLa、Vero、(2) 両生類細胞、例えば、アフリカツメガエル卵母細胞、あるいは(3) 昆虫細胞、例えば、sf9、sf21、Tn5などが知られている。植物細胞としては、ニコティアナ (Nicotiana) 属、例えば

ニコティアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) 由来の細胞が知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えば、サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属、例えばサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、糸状菌、例えば、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、例えばアスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) などが知られている。

【0052】

原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、大腸菌 (*E. coli*)、枯草菌が知られている。

これらの細胞に、目的とする抗体遺伝子を形質転換により導入し、形質転換された細胞を *in vitro* で培養することにより抗体が得られる。培養は、公知の方法に従い行う。例えば、培養液として、DMEM, MEM, RPMI1640, IMDM を使用することができ、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできる。また、抗体遺伝子を導入した細胞を動物の腹腔等へ移すことにより、*in vivo* にて抗体を産生してもよい。

【0053】

一方、*in vivo* の産生系としては、動物を使用する産生系や植物を使用する産生系が挙げられる。動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫を用いる産生系がある。

哺乳類動物としては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシなどを用いることができる (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Application, 1993)。また、昆虫としては、カイコなどを用いることができる。

植物を使用する場合、タバコなどを用いることができる。

【0054】

これらの動物または植物に抗体遺伝子を導入し、動物または植物の体内で抗体を産生させ、回収する。例えば、抗体遺伝子をヤギ β カゼインのような乳汁中に固有に産生される蛋白質をコードする遺伝子の途中に挿入して融合遺伝子として調製する。抗体遺伝子が挿入された融合遺伝子を含む DNA 断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ導入する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギまたはその子孫が産生する乳汁から所望の抗体を得る。トランスジェ

ニックヤギから産生される所望の抗体を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい (Ebert, K.M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702)。

【0055】

また、カイコを用いる場合、目的の抗体遺伝子を挿入したバキュロウィルスをカイコに感染させ、このカイコの体液より所望の抗体を得る (Susumu, M. et al., Nature (1985) 315, 592-594)。さらに、タバコを用いる場合、目的の抗体遺伝子を植物発現用ベクター、例えばpMON530に挿入し、このベクターをアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) のようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えばニコチニア・タバカム (*Nicotiana tabacum*) に感染させ、本タバコの葉より所望の抗体を得る (Julian, K.-C. Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138)。

【0056】

上述のようにin vitroまたはin vivoの産生系にて抗体を産生する場合、抗体重鎖 (H鎖) または軽鎖 (L鎖) をコードするDNAを別々に発現ベクターに組み込んで宿主を同時形質転換させてもよいし、あるいはH鎖およびL鎖をコードするDNAを単一の発現ベクターに組み込んで、宿主を形質転換させてもよい (国際特許出願公開番号W094-11523参照)。

【0057】

上述のように得られた抗体は、ポリエチレングリコール (PEG) 等の各種分子と結合させ抗体修飾物として使用することもできる。本願特許請求の範囲でいう「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物を得るには、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。これらの方法はこの分野においてすでに確立されている。

【0058】

抗体の分離、精製

前期のように産生、発現された抗体は、細胞内外、宿主から分離し均一にまで精製することができる。本発明で使用される抗体の分離、精製はアフィニティークロマトグラフィーにより行うことができる。アフィニティークロマトグラフィー

ーに用いるカラムとしては、例えば、プロテインAカラム、プロテインGカラムが挙げられる。プロテインAカラムに用いる担体として、例えば、Hyper D, POROS, Sepharose F.F.等が挙げられる。

【0059】

その他、通常の蛋白質で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、上記アフィニティークロマトグラフィー以外のクロマトグラフィー、フィルター、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択、組み合わせれば、本発明で使用される抗体を分離、精製することができる。クロマトグラフィーとしては、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲルろ過等が挙げられる。

【0060】

抗体の濃度測定

上記方法で得られた抗体の濃度測定は吸光度の測定またはELISA等により行うことができる。すなわち、吸光度の測定による場合には、本発明で使用される抗体又は抗体を含むサンプルをPBS(-)で適当に希釈した後、280nmの吸光度を測定し、1mg/mlを1.350Dとして算出する。また、ELISAによる場合は以下のように測定することができる。すなわち、0.1M重炭酸緩衝液(pH9.6)で1μg/mlに希釈したヤギ抗ヒトIgG(BIO SOURCE 製)100μlを96穴プレート(Nunc製)に加え、4℃で一晩インキュベーションし、抗体を固層化する。

【0061】

ブロッキングの後、適宜希釈した本発明で使用される抗体または抗体を含むサンプル、あるいは標品としてヒトIgG(CAPPEL 製)100μlを添加し、室温にて1時間インキュベーションする。洗浄後、5000倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗ヒトIgG(BIO SOURCE 製)100μlを加え、室温にて1時間インキュベートする。洗浄後、基質溶液を加えインキュベーションの後、MICROPLATE READER Model 3550(Bio-Rad 製)を用いて405nmでの吸光度を測定し、目的の抗体の濃度を算出する。

【0062】

FCM解析

骨髓腫細胞と本発明で使用される抗体との反応性は、FCM(フローサイトメトリー)解析で行うことができる。細胞としては、樹立細胞株あるいは新鮮分離細胞を用いることができる。樹立細胞株としては、骨髓腫由来RPMI8226(ATCC CCL 155)、同U266(ATCC TIB 196)、同KPM2、同KPC-32、形質細胞腫由来ARH-77(ATCC CRL 1621)などを用いることができる。

【0063】

上記細胞をPBS(-)で洗浄した後、FACS緩衝液(2%ウシ胎児血清、0.05%アジ化ナトリウム含有PBS(-))で25 μ g/mlに希釈した抗体あるいはコントロール抗体100 μ lを加え、氷温化30分インキュベートする。FACS緩衝液で洗浄した後、25 μ g/mlのFITC標識ヤギ抗マウス抗体(GAM, Becton Dickinson 製)100 μ lを加え、氷温化30分間インキュベートする。FACS緩衝液で洗浄した後、600 μ lあるいは1mlのFACS緩衝液に懸濁し、FACScan(Becton Dickinson 製)で各細胞の蛍光強度を測定すればよい。

【0064】

スクリーニング方法

HM1.24抗原の発現増強剤をスクリーニングするには、例えば、無刺激の状態ではHM1.24抗原を発現していないか、あるいは少なく発現している細胞を用いてFCM解析にて測定することができる。例えば、実施例に記載の細胞を被検物質と1~2日インキュベートし、ついで一次抗体としてマウス抗ヒトHM1.24抗体にて染色する。細胞を洗浄し、さらに二次抗体としてFITC標識抗マウスIgG抗体により染色する。最後に、細胞を洗浄したのち、フローサイトメータにより細胞のFITC蛍光強度を測定すればよい。

【0065】

また、前記の間接法による染色ではなく、細胞を高濃度の免疫グロブリンで処理し、Fcレセプターをブロックした後にFITC標識した抗ヒトHM1.24抗体を用いた直接法による染色によりFCM分析することもできる。

また、HM1.24プロモーター配列を用いたレポーター遺伝子アッセイによりHM1.24抗原の発現増強剤をスクリーニングすることができる。レポーター遺伝子とし

ては、ルシフェラーゼを用いることができる。HM1.24プロモーター配列をレポーター遺伝子上流に含むプラスミドを構築し、ついで、細胞に形質転換した後、得られた細胞を被検物質と1～2日培養し、回収された細胞をFCM解析することで、HM1.24抗原の発現を増強する薬剤をスクリーニングすることができる。

【0066】

細胞傷害活性

ADCC活性の測定

本発明に使用される抗体は、細胞傷害活性として、例えば、ADCC活性を有する抗体である。

本発明において骨髄腫細胞に対するADCC活性は、次のようにして測定することができる。まず、ヒトの末梢血や骨髄より比重遠心法で単核球を分離し、エフェクター細胞 (Effector cell : E) として調製する。

【0067】

また、標的細胞 (Target cell : T) としては、RPMI8226 (ATCC CCL 155), U266 (ATCC TIB 196), KPM2, KPC-32, ARH-77 (ATCC CRL 1621) などを ^{51}Cr により標識して、標的細胞として調製する。次いで、標識した標的細胞にADCC活性を測定する抗体を加えインキュベートし、その後、標的細胞に対し適切な比のエフェクター細胞を加えインキュベートする。

【0068】

インキュベートした後上清を取り、ガンマカウンターで放射活性を測定する。その際、最大遊離放射能測定用に、1%のNP-40を用いることができる。細胞傷害活性 (%) は、 $(A-C)/(B-C) \times 100$ で計算することができる。なお、Aは抗体存在下において遊離された放射活性 (cpm)、BはNP-40により遊離された放射活性 (cpm)、Cは抗体を含まず培養液のみで遊離された放射活性 (cpm) である。

【0069】

細胞傷害活性の増強

ADCC活性のような細胞傷害活性を発揮するには、ヒトにおいては抗体定常領域 (C領域) として $C\gamma$ 、特に $C\gamma 1$, $C\gamma 3$ を使用することが好ましい。さらに、

抗体C領域のアミノ酸を一部付加、改変、修飾することにより、より強力なADCC活性、あるいはCDC 活性を誘導することができる。

【0070】

例えば、アミノ酸置換によるIgG のIgM 様ポリマー化 (Smith, R.I.F. & Morrison, S.L. BIO/TECHNOLOGY (1994) 12, 683-688)、アミノ酸付加によるIgG のIgM様ポリマー化 (Smith, R.I.F. et al., J.Immunology (1995) 154, 2226-2236)、L鎖をコードする遺伝子の直列連結での発現 (Shuford, W. et al., Science (1991) 252, 724-727)、アミノ酸置換によるIgG の二量体化 (Caron, P.C. et al., J.Exp.Med. (1992) 176, 1191-1195, Shopes, B., J.Immunology (1992) 148, 2918-2922)、化学修飾によるIgGの二量体化 (Wolff, E.A. et al., Cancer Res. (1993) 53, 2560-2565)、および抗体ヒンジ領域のアミノ酸改変によるエフェクター機能の導入 (Norderhaug, L. et al., Eur.J.Immunol. (1991) 21, 2379-2384) が挙げられる。

【0071】

これらは、プライマーを利用したオリゴマー部位特異的変異導入法、制限酵素切断部位を利用した塩基配列の付加、共有結合をもたらす化学修飾剤を使用することによって達成される。

【0072】

【実施例】

実施例 1. インターフェロン α による骨髓腫細胞におけるHM1.24抗原発現量の増強

ヒト骨髓腫細胞株U266 (ATCC TIB 196) および多発性骨髓腫患者の骨髓由来の骨髓腫細胞を10%ウシ胎児血清 (Whittaker Bioproducts, Inc, Walkersville, MD, USA) を含むRPMI1640培地 (Sigma, St Louis, MO, USA) を用い、5%炭酸ガス培養器中、37℃で培養した。マウス抗HM1.24抗体を生産するハイブリドーマは、工業技術院生命工学工業技術研究所 (日本国茨城県つくば市東1-1-3) に寄託番号FERM BP-5233 (寄託日1995年4月27日) として寄託されている。

【0073】

骨髓腫細胞 (1×10^5 /ml) を 1000 U/ml の天然型インターフェロナー α (大塚製薬、東京) 存在下又は非存在下に 48 時間培養し、HM1.24 抗原 (それをコードする塩基配列を配列番号: 1 に示す) の変化をフローサイトメトリーで測定した。細胞を 0.1% ウシ血清アルブミン (Sigma, St Louis, MO, USA) と 0.02% アジ化ナトリウムを添加したリン酸緩衝液 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) で洗浄後、ヒト免疫グロブリン (3 ng/ml 、ミドリ十字、大阪) を加えた PBS ($100 \mu\text{l}$) に浮遊させ、 4°C で 15 分間、反応させた。

【0074】

その後、 $2 \mu\text{l}$ の FITC- ヒト IgG1 (1 ng/ml) 又は FITC- 抗 HM1.24 抗体 (1 ng/ml) を加え、 4°C で 60 分間、染色した。患者骨髓腫細胞を用いた場合、骨髓腫細胞の同定には $20 \mu\text{l}$ の PE-anti-CD38 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) を加え、二重染色を行った。染色後、細胞を PBC で 2 回洗浄し、1% パラホルムアルデヒド (和光純薬、大阪) を含む PBS 中で保存した。その後、フローサイトメーター (EPICS XL, Coulter, Hialeah, FL, USA) を用い、HM1.24 抗原の発現を解析した。

【0075】

その結果、骨髓腫細胞株 U266 (図 1) および患者骨髓腫細胞 (図 2) は無刺激の状態でも HM1.24 抗原を発現しており、インターフェロナー α の刺激により、HM1.24 抗原の発現量はさらに増加した。

インターフェロナー α は骨髓腫細胞の HM1.24 抗原の発現をさらに増強させ、骨髓腫細胞へ結合する抗 HM1.24 抗体の数を増加させた。抗 HM1.24 抗体による治療の抗腫瘍効果は、結合する抗体数に比例することから、骨髓腫患者において、インターフェロナー α を投与した後に抗 HM1.24 抗体治療を行うことは、抗体による治療効果を増強し、より有効性を高める治療になると期待される。

【0076】

実施例 2. レポーター遺伝子解析による HM1.24 抗原の発現機能の解析

抗原の発現誘導が HM1.24 プロモーター領域により調節されているかどうか調べるために、プロモーター領域でのレポーター遺伝子解析を行った。

HM1.24 プロモーター領域の遺伝子 (配列番号: 3) は PCR クローニングにより

得た。ヒト末梢血単核細胞よりDNAzol reagent (GIBCO) を用い、ゲノムDNA を調製した。得られたゲノムDNA を鋳型として、プライマーHM2k (aaaggtaccagctgtctttctgtctgtcc) (配列番号: 4)、及びBST2B (atagtcatacgaagtagatgcatccag) (配列番号: 5) を用い、TaKaRa Taq (宝酒造、大津) を用いThermal Cycler 480 (Perkin Elmer, CA, USA) にてPCR (94℃ 1min、55℃ 1min、72℃ 1min、30cycles) を行った。

【0077】

得られた約2kbの断片を制限酵素KpnI及びBgIII(宝酒造) にて処理し、レポータージーンプラスミドpGL3-basic (Promega, WI, USA) のKpnI-BgIIIサイトにDNA ligation kit ver. II (宝酒造) を用いてクローニングし、コンピテントE. coli JM109 (ニッポンジーン) を形質転換した。形質転換した大腸菌を100 µg/mlのアンピシリンを含むLB培地にて37℃培養し、QIAGEN plasmid maxi kit (QIAGEN, Hilden, Germany) にてプラスミドを調製した。

【0078】

得られたプラスミドHM-2k/GL3 を制限酵素KpnI及びXhoIにて処理し、kilo-sequence 用deletion kit (宝酒造) にてdeletion cloneを作製し、転写開始点上流-493 bpまでを含むプラスミドHM-493/GL3を得た。またHM-2k/GL3 を制限酵素KpnI及びAflIII にて処理し、上記方法にてdeletion cloneを作製し、転写開始点上流-151 bp又は-77 bpまでを含む、それぞれHM-151/GL3及びHM-77/GL3 を得た。

【0079】

細胞へのプラスミド導入はPolyethylenimine-Transferrinfection Kit (Tf PEI-Kit) (Bender MedSystems, Vienna, Austria)、ルシフェラーゼアッセイはDual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いた。細胞株を50 µM Defferrioxamine、10% FBS を含むRPMI-1640 にて一晚培養した。導入するプラスミドをTf-PEIとの複合体にするため、終濃度20 µg/mlのレポータージーンプラスミド、0.4 µg/mlのpRL-SV40、1 µg/ml Tf-PEI 試薬の混合液を作製し、室温で20分間インキュベートした。5×10⁵ 細胞/mlの細胞をTf-PEI・プラスミド混合液の3倍容加え、4時間37℃にてインキュベートし

、培地にて洗浄後、 2×10^5 細胞/mlの濃度で1 wellあたり100 μ lを96 ウイル平底プレートで培養した。

【0080】

IFN- α を終濃度0, 10, 100、又は1000 U/mlとなるよう添加し、37℃2日間培養した。細胞をPBS(-)にて洗浄後、20 μ lのPassive Lysis Bufferにて溶解し、6 μ lをC96 White Polysorp Fluoronunc plate (Nunc) にアプライした。Luminoskan (Labsystems) にて基質液30 μ l、測定時間10秒にてFirefly 及びRenilaそれぞれの発光強度を測定した。測定値は、Firefly/Renilaにて補正後、コントロール (medium) を1として相対活性を求めた。

【0081】

その結果、上流2 kbp 及び493 bpともにIFN α 濃度依存的にレポーターのルシフェラーゼ活性が上昇しており、プロモーター領域の転写活性上昇が抗原の発現誘導を引き起こすことを確認した(図3)。

さらに、転写開始点上流151 bp又は77 bpのレポータープラスミドを用いた結果では、上流151 bpのレポータープラスミドではIFN α 刺激によりルシフェラーゼ活性の上昇が認められた。一方上流77 bpのレポータープラスミドではIFN α 刺激による活性の変化は認められなかった(図4)。77~151 bpの領域にはGAS element, ISRE に相同性の高い配列が存在し、IFN α 刺激に応答して活性化する転写調節因子であることから、IRF ファミリーの転写調節因子が活性に関与していることが示された。

【0082】

実施例3. インターフェロン γ による骨髓腫細胞におけるHM1.24抗原発現量の増強

実施例1に記載の方法により、1000 U/mlの天然型インターフェロン γ (R & D System社)を用いて解析した。その結果、骨髓腫細胞株U266(図5)および患者骨髓腫細胞(図6)において、インターフェロン α と同様に、HM1.24抗原の発現量の増大が観察された。

【0083】

実施例4. IRF-2のHM1.24プロモーター領域への結合

HM1.24プロモーター領域に結合する転写因子を同定するために、HM1.24プロモーター領域をプローブとしたElectrophoresis Mobility Shift Assay (EMSA) を次のように行い、結合因子として IRF-2を同定した。

【0084】

(1) 核抽出物の調製

骨髓腫細胞U266-B1 (ATCC-TIB196) を10%FBS (HyClone) を含むRPMI-1640 培地(GIBCO-BRL) にて37℃、5%CO₂ インキュベーター中で培養した。インターフェロン α (IFN- α) (Pepro Tech EC)による細胞への刺激を行うため、培地中に IFN- α を終濃度1000U/mlとなるように添加し、添加後30分、2時間、4時間及び8時間の細胞を回収した。細胞を冷PBS(-)に懸濁し、1,000rpmにて遠心して上清を捨て、10mM Tris, 10mM NaCl, 6mM MgCl₂ 溶液に懸濁した。

【0085】

氷中に5分間静置後に再度遠心し、上清を捨てた。10mM Tris, 10mM NaCl, 6mM MgCl₂, 1mM DTT, 0.4mM PMSF, 1mM Na₃VO₄に細胞を懸濁した。ガラス製ホモジェナイザーを用いて細胞を氷上でホモジェナイズし、6000g 3分間遠心し、上清を捨てた。抽出緩衝液(20%グリセロール、20mM HEPES, 420mM NaCl, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM EDTA, 0.2mM PMSF, 1mM DTT, 0.1mM Na₃VO₄, 2mg/mlアプロチニン、5mg/mlロイペプチン)に細胞を懸濁し、氷中に20分間静置した。12000g 10分間遠心し、上清を回収した。

【0086】

(2) 標識プローブの調製

プローブとして、HM1.24プロモーター領域においてGAS (IFN- γ 活性化部位：GAS コンセンサス配列はttncnnnaa(配列番号：8))、ISRE (IFN- α 刺激応答因子：ISREコンセンサス配列はngaaanngaaact(配列番号：9))とホモロジーのある配列(ttcccagaa(配列番号：10)およびggaaactgaaact(配列番号：11))を含むISRE 2を作製した。すなわち、オリゴDNA ISRE-F2 (aatttctgggaaactgaaactgaaaacct(配列番号：12))及びISRE-R2 (aattaggttttcagtttcagtttcccaga(配列番号：13))を混合し、アニールさせ2本鎖DNA プローブISRE2とした。

【0087】

また、オリゴDNA adp-1 (catggcatctacttcgtatgactattgcagagtgcc(配列番号: 14))及びadp-2 (catgggcactctgcaatagtcatacgaagtagatgc(配列番号: 15))を混合し、アニールさせunrelated プローブadp とした。プローブの標識はBand Shift Kit (Amersham Pharmacia Biotech) を用い、その標準プロトコールに準じて行った。すなわち、上記にて作製した2本鎖DNA50ng を $[\alpha -^{32}\text{P}] \text{dATP}$ (20 μCi) (Amersham Pharmacia Biotech) を含む反応液中でKlenow断片のポリメラーゼ反応を37℃、1時間行った。反応終了した溶液を2倍に希釈後Nick Spin Column (Amersham Pharmacia Biotech) にかけて、1600rpm、4分間遠心して回収した溶液を標識プローブとした。

【0088】

(3) IFN- α による刺激により産生された結合因子の経時変化

Band Shift Kit (amersham pharmacia biotech, NJ, USA)の標準プロトコールに従って以下の操作を行った。前記(1)において経時的に調製した抽出物5 μg にキット添付の10x 結合緩衝液 (100mM Tris-HCl (pH7.5), 500mM NaCl, 5mM DTT) 2 μl , 50%グリセロール4 μl , 1%NP-40 1 μl 、及び1 μl のpoly(dI-dC)・poly(dI-dC)を加え、前記(2)で調製した ^{32}P 標識ISRE-2プローブ2 μl を添加し、水を加えて全量を20ulとした後、この反応混合物を室温にて20分間インキュベートし、前記抽出物中に存在する可能性のある結合因子と前記 ^{32}P 標識ISRE-2プローブとの結合を許容した。

【0089】

反応液18 μl に10×染色液 (Kit に添付) 2 μl を加え、1×Tris-グリシン緩衝液 (25mM Tris, 190mMグリシン、1mM EDTA, pH8.1) 中、7.5 %アクリルアミドゲル上で電気泳動し、電気泳動後、ゲルを濾紙にはりつけて蛋白質を濾紙に移行させた。ゲルドライヤーにて乾燥した濾紙をX線フィルムに感光させ、シグナルを検出した。

【0090】

比較のため、抽出物を添加しない反応液 [(NEC-)]、インターフェロン α により刺激しないで培養した細胞培養物からの抽出物を添加した反応液 [0 h]、8時間の培養液の抽出物に標識プローブの代りに未標識ISRE2 プローブ50ngを添加し

た反応液 [8 h (+cold)]、及び8時間の培養後の抽出液にunrelated プローブ adp を50ng添加した反応液 [8 h (+cold unrelated)]を用意し、上記を同様に処理してシグナルの検出を行った。

結果を図7に示す。この図7から明らかな通り、HM1.24プロモーターの一部に相当する2本鎖DNAと結合する物質が、インターフェロン刺激下で培養したU266-B1細胞中に経時的に増加した。

【0091】

(4) 各種抗体との反応による転写因子の同定

前記(1)に記載したようにして、骨髓腫細胞U266-B1(ATCC-TIB196)を1000 U/mlのインターフェロン- α の存在下で8時間培養し、抽出物を調製した。Band Shift Kit (Amersham Pharmacia Biotech)の標準プロトコールに従って次の操作を行った。すなわち、5 μ gの抽出物に抗体2 μ gを添加し、室温にて15分間インキュベートし、抽出液/抗体反応液を得た。前記キット添付の10 \times 結合緩衝液2 μ l、50%グリセロール4 μ l、1% NP-40 1 μ l及び1 μ lのPoly (dI-dC)・Poly (dI-dC)に、前記抽出液/抗体反応液2 μ l及び前記(2)で調製した標識プローブ2 μ lを添加し、水を加えて全量を20 μ lとした後、この反応混合物を室温にて20分間インキュベートした。

【0092】

この反応混合物を、前記(3)に記載したようにして電気泳動にかけ、シグナルの検出を行った。

上記の抗体として、次の抗体(いずれも、Santa Cruz Biotechnologyより)を使用した。

【0093】

抗-ヒトSTAT1 p84/p91 (E-23) : (説明) ウサギポリクローナル抗体 (SC-346X)

抗-ヒトSTAT2 (C-20) : ウサギポリクローナル抗体 (SC-476X)

抗-マウスSTAT3 (K-15) : ウサギポリクローナル抗体 (SC-483X)

抗-ヒトISGF-3 γ p48 (C-20) : ウサギポリクローナル抗体 (SC-496X)

抗-ヒトIRF-1 (C-20) : ウサギポリクローナル抗体 (SC-497X)

icのKpnI, BglII サイトに断片を導入することにより、転写開始点上流約700bp までを含むHM-700/GL3を得た。

【0102】

さらにHM-2k/GL3 を鋳型としてプライマーHMP700および11A' (cagaggattaattaggtaccgaaagagaggtgggctttt) (配列番号: 21) を用い、KOD ポリメラーゼ (東洋紡) を用いThermal Cycler 480 (Perkin Elmer, CA, USA) にてPCR (98℃ 15秒、65℃ 2秒、74℃ 30秒、25サイクル) を行った。得られた断片をZero Blunt TOPO PCR cloning kit for sequencing ver.B (Invitrogen) を用いて、pCR4 B lunt-TOPO vectorに挿入した。得られたプラスミドを制限酵素KpnIにて処理し、およそ550bp の断片を回収し、HM-125/GL3のKpnIサイトにligation high を用いて導入した。こうして転写開始点上流-125~-145付近を欠失したdISRE/GL3 を得た。

【0103】

(2) IRF-2 発現プラスミドの構築

IRF-2 発現プラスミドは以下のように作製した。interferon- α (1000U/ml) にて刺激後8時間経過したU266細胞より、TRIzol試薬 (GIBCO-BRL) を用いて全RNA を抽出した。First-strand cDNA Synthesis kit (Pharmacia) を用い、得られたRNA を鋳型、NotI-d(T)₁₈ をプライマーとして逆転写反応を37℃ 1時間行った。得られたcDNAを鋳型、IRF2-F2 (ttgtattggtagcgtgaaaaaagc) (配列番号: 22)、IRF2-R2 (cagctagttcacattatctcgtcc) (配列番号: 23) をプライマーとしてLA -Taq (宝酒造) を用いてPCR (94℃ 45秒、60℃ 45秒、72℃ 60秒、40サイクル) を行った。

【0104】

得られたPCR 反応液を鋳型、IRF2-F1 (agagggtaccatgccggtggaaaggatgcg) (配列番号: 24)、IRF2-R1 (agtcggtacctaactgctcttgacgcggg) (配列番号: 25) をプライマーとしてKOD ポリメラーゼ (東洋紡) を用いて再度PCR (94℃ 45秒、60℃ 45秒、72℃ 60秒、30サイクル) を行った。得られた断片を制限酵素KpnIにて処理し、発現プラスミドpTracer-CMV (Invitrogen) のKpnIサイトにligation high (東洋紡) を用いて導入し、IRF-2 発現プラスミドpIRF-2/Tracer を得た。

【0105】

(3) レポーター遺伝子活性の測定

細胞へのプラスミド導入はPolyethylenimine-Transferrinfection Kit (Tf PEI-Kit)(Bender MedSystems, Vienna, Austria)を、ルシフェラーゼアッセイはDual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いた。細胞株を50 μ M Deferrioxamine, 10 % FBSを含むRPMI-1640 にて一晚培養した。導入するプラスミドをTf-PEIとの複合体にするため、終濃度20 μ g/mlのレポータージーンプラスミド、20 μ g/mlのpIRF-2/Tracer またはpTracer-CMV, 0.4 μ g/mlのpRL-SV40, 1 μ g/ml Tf-PEI reagent の混合液を作製し、室温で20分間インキュベートした。

【0106】

5×10^5 細胞/mlの細胞をTf-PEI plasmid混合液の3倍容加え、4時間37℃にてインキュベートし、培地にて洗浄後、 2×10^5 細胞/mlの濃度で1ウェルあたり100 μ lを96ウェル平底プレートで培養した。IFN- α を終濃度0, 1000U/mlとなるよう添加し、37℃2日間培養した。細胞をPBS(-)にて洗浄後、20 μ lのPassive Lysis Bufferにて溶解し、6 μ lをC96 White Polysorp Fluoronunc plate (Nunc)にアプライした。Luminoskan (Labsystems) にて基質液30 μ l、測定時間10秒にてFirefly, Renila それぞれの発光強度を測定した。測定値はFirefly/Renilaにてトランスフェクション効率の補正を行い相対活性を求めた。

【0107】

(4) 結果

HM1.24プロモーターレポータープラスミドとIRF-2 発現プラスミドをU266細胞に導入し、レポーター活性を測定した(図9)。その結果、IRF-2 結合サイトであるISREモチーフ配列を含む-700および-151で、IRF-2 共発現によりルシフェラーゼ活性が上昇した。一方ISRE配列を欠失したdISRE/GL3 ではIRF-2 共発現によるルシフェラーゼ活性に変化は認められなかった。以上の結果よりIRF-2 はHM1.24プロモーターのISRE領域に結合し、その転写活性を増強することが示された。

【0108】

(5) IRF-2 の強制発現によるHM1.24抗原の発現増強の確認

IRF-2 による HM1.24 抗原の発現量の変化は、IRF-2 発現プラスミド (pIRF-2/Tracer) またはコントロールプラスミド (pTracer/CMV) を U266 細胞に上記方法にて導入し、1～2 日間培養した後、細胞を回収し、一次抗体としてマウス抗ヒト HM1.24 抗体にて染色する。細胞を洗浄し、さらに二次抗体として FITC 標識抗マウス IgG 抗体により染色する。細胞を洗浄したのち、フローサイトメータにより細胞の FITC 蛍光強度を測定する。IRF-2 発現プラスミド導入細胞では、コントロールプラスミド導入細胞に比較して FITC 強度の高い細胞が多く存在することを確認する。

【0109】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA
 <120> Agent for enhancing expression of HM1.24 comprising as an active component interferon α
 <130> 993953
 <160> 5
 <210> 1
 <211> 1073
 <212> DNA
 <213> Homosapiens
 <223> Nucleotide sequence coding for HM1.24 protein antigen
 <400> 1

gaattcggca cgagggatct gg atg gca tct act tcg tat gac tat tgc 49

Met Ala Ser Thr Ser Tyr Asp Tyr Cys

1

5

aga gtg ccc atg gaa gac ggg gat aag cgc tgt aag ctt ctg ctg ggg 97

Arg Val Pro Met Glu Asp Gly Asp Lys Arg Cys Lys Leu Leu Leu Gly

10

15

20

25

ata gga att ctg gtg ctc ctg atc atc gtg att ctg ggg gtg ccc ttg 145

Ile Gly Ile Leu Val Leu Leu Ile Ile Val Ile Leu Gly Val Pro Leu	
30 35 40	
att atc ttc acc atc aag gcc aac agc gag gcc tgc cgg gac ggc ctt	193
Ile Ile Phe Thr Ile Lys Ala Asn Ser Glu Ala Cys Arg Asp Gly Leu	
45 50 55	
cgg gca gtg atg gag tgt cgc aat gtc acc cat ctc ctg caa caa gag	241
Arg Ala Val Met Glu Cys Arg Asn Val Thr His Leu Leu Gln Gln Glu	
60 65 70	
ctg acc gag gcc cag aag ggc ttt cag gat gtg gag gcc cag gcc gcc	289
Leu Thr Glu Ala Gln Lys Gly Phe Gln Asp Val Glu Ala Gln Ala Ala	
75 80 85	
acc tgc aac cac act gtg atg gcc cta atg gct tcc ctg gat gca gag	337
Thr Cys Asn His Thr Val Met Ala Leu Met Ala Ser Leu Asp Ala Glu	
90 95 100 105	
aag gcc caa gga caa aag aaa gtg gag gag ctt gag gga gag atc act	385
Lys Ala Gln Gly Gln Lys Lys Val Glu Glu Leu Glu Gly Glu Ile Thr	
110 115 120	
aca tta aac cat aag ctt cag gac gcg tct gca gag gtg gag cga ctg	433
Thr Leu Asn His Lys Leu Gln Asp Ala Ser Ala Glu Val Glu Arg Leu	
125 130 135	
aga aga gaa aac cag gtc tta agc gtg aga atc gcg gac aag aag tac	481
Arg Arg Glu Asn Gln Val Leu Ser Val Arg Ile Ala Asp Lys Lys Tyr	
140 145 150	
tac ccc agc tcc cag gac tcc agc tcc gct gcg gcg ccc cag ctg ctg	529
Tyr Pro Ser Ser Gln Asp Ser Ser Ser Ala Ala Ala Pro Gln Leu Leu	
155 160 165	
att gtg ctg ctg ggc ctc agc gct ctg ctg cag tga gatcccagga	575
Ile Val Leu Leu Gly Leu Ser Ala Leu Leu Gln ***	
170 175 180	

agctggcaca tcttggagg tccgtcctgc tcggcttttc gcttgaacat tcccttgatc 635
 tcatcagttc tgagcgggtc atggggcaac acggttagcg gggagagcac ggggtagccg 695
 gagaagggcc tctggagcag gtctggaggg gccatggggc agtcctgggt ctggggacac 755
 agtcgggttg acccagggct gtctccctcc agagcctccc tccggacaat gagtcccccc 815
 tcttgtctcc caccctgaga ttgggcatgg ggtgcggtgt ggggggcatg tgctgcctgt 875
 tgttatgggt tttttttgcg ggggggggtt cttttttctg ggggtcttga gctccaaaaa 935
 aataaacact tcctttgagg gagagcacac cttaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 995
 aaaattcggg cggccgcc 1013

【 0 1 1 0 】

< 2 1 0 > 2

< 2 1 1 > 180

< 2 1 2 > PRT

< 2 1 3 > Homosapiens

< 2 2 3 > Amino acid sequence of HM1.24 protein antigen

< 4 0 0 > 2

Met Ala Ser Thr Ser Tyr Asp Tyr Cys Arg Val Pro Met Glu Asp Gly

1

5

10

15

Asp Lys Arg Cys Lys Leu Leu Leu Gly Ile Gly Ile Leu Val Leu Leu

20

25

30

Ile Ile Val Ile Leu Gly Val Pro Leu Ile Ile Phe Thr Ile Lys Ala

35

40

45

Asn Ser Glu Ala Cys Arg Asp Gly Leu Arg Ala Val Met Glu Cys Arg

50

55

60

Asn Val Thr His Leu Leu Gln Gln Glu Leu Thr Glu Ala Gln Lys Gly

65

70

75

80

Phe Gln Asp Val Glu Ala Gln Ala Ala Thr Cys Asn His Thr Val Met

85

90

95

Ala Leu Met Ala Ser Leu Asp Ala Glu Lys Ala Gln Gly Gln Lys Lys

100

105

110

Val Glu Glu Leu Glu Gly Glu Ile Thr Thr Leu Asn His Lys Leu Gln

115

120

125

Asp Ala Ser Ala Glu Val Glu Arg Leu Arg Arg Glu Asn Gln Val Leu

130

135

140

Ser Val Arg Ile Ala Asp Lys Lys Tyr Tyr Pro Ser Ser Gln Asp Ser

145

150

155

160

Ser Ser Ala Ala Ala Pro Gln Leu Leu Ile Val Leu Leu Gly Leu Ser

165

170

175

Ala Leu Leu Gln

180

【 0 1 1 1 】

< 2 1 0 > 3

< 2 1 1 > 2016

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Homosapiens

< 2 2 3 > Nucleotide sequence of promoter region of gene coding for HM

1.24 protein antigen

< 4 0 0 > 3

actaaaagtc tctgatatgc agaaataatg gcataagctg tctttctgtc tgtccctctt 60

ctctctctct gcctcggctg ccaggcaggg aagggccccc tgtccagtgg acacgtgacc 120

cacatgacct tacctatcat tggagatgac tcacactctt taccctgccc cttttgcttt 180

gtatccaata aataacagca cagccagaca ttcggggcca ctaccagtct ccgcgcattg 240

ctggtagtgg tccccgggc ccagctgtct tttcttttat ctcttcgtct tgtgtcttta 300

tttctacact ctctcgtcgc cgcacacagg gagagacca ctgaccctgt ggggctggtc 360

cctacagtaa ttttaaaggg aagagcaaca aactttcggg ttgcagggtt gggactgttt 420

acagctgcaa aatttagaga ggacatcaat ctattattat ccacatttta cagctgggga 480

aatcaatgct aagagaggaa attcatttgc ccagaggtgc accaccctgg cctccaatgt 540

gcaattcatg caatttgtat ttccgacctg gtcccaaact aaccctaaag ttagcaggcc 600

agaacagtgc tgctcaaata agtcagctta gtcaaataag tcaggcaaag gtcgtgtctt 660

tgcacctgga gtcctggcca ggctggtagg tccctcctcc tgggacaagt tcacctcag 720
 aattttcagc aagatcatct cccacagctt gtttaattggt tcttggttct aagtgatttt 780
 tttgtttatt ggtttaagag atgggatccc actctatcac ccaggcttga gtgccgtggc 840
 acaatcatag ctgctgcag cctcaaactc ctgggctcga gtgatcctcc tgcctcagcc 900
 tcccagcctc agcctgggac cacaggcatg taccacatg cctggctcta agtggcttta 960
 atggggctct tctgagggat gttggagtca gggcctgggg ggagttcccc aggccttctg 1020
 ggaggcctgg gctctggact tgacctgcc tactgtctgg cctgctgaa aagaaaaaaa 1080
 aacatgaaa tggcagacct aacagaatct gggctgtggt caggatgtgg ctgaagaagc 1140
 cacaagaaaa acatgcagtc ccccttcagc ggtcatgcc agcagttggg tgccgataat 1200
 gggcctgatt tctgttagga agccctggct ctcttgcca catggacagt gtctgaggct 1260
 ggccctgtta ttccctttg cagatgaaga aacaggctca gagagtttac ctggtatcct 1320
 ggagtcaccag gagcactttt tctggaagta ggagcttggt tctgcaggt gccaagacag 1380
 agaccgacat tgtttgttgg ctgggtcggg ctcccagttt tcagctggct ccagtcctac 1440
 ctgttgctca cacacctcc atgtctccca tagtcccctc ggtggggaca gaggcactgg 1500
 atgaagccct gctcgtcacc acagagacac ctgaacacaa aaaccagtcc ctggggtcag 1560
 acccaggccc cgccccaga cccaggccct gccctcactc caccacgcaa ctgtgcaacc 1620
 tcagtttccc caggtggaga ccggaccaac aatgatggcc tctgcctctt caggtcatag 1680
 tacagatgaa tacaggctgg cacggcctag gcactcagta acacacggca gaggcacagg 1740
 gacttaagat ggagtgtccc aggcagccac agttggctgg caccagttg ggaaggggccc 1800
 aagggtttt aaagcagggt gaaaaaaaaa gccacctcc tttctgggaa actgaaactg 1860
 aaaacctaat taatcctctg cctgtaggtg cctcatgcaa gagctgctgg tcagagcact 1920
 tcctggaact tgctattggt caggacgttt cctatgctaa taaaggggtg gcccgtagaa 1980
 gattccagca cctccccta actccaggcc agactccttt cagctaaagg ggagatctgg 2040
 atg gca tct act tcg tat gac 2061

Met Ala Ser Thr Ser Tyr Asp

5

【 0 1 1 2 】

< 2 1 0 > 4

< 2 1 1 > 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223> Primer HM2K

<400> 4

aaaggtacca gctgtctttc tgtctgtcc

29

【0113】

<210> 5

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223> Primer BST2B

<400> 5

atagtcatac gaagtagatg ccatccag

28

【0114】

<210> 6

<211> 2144

<212> DNA

<213> Homosapiens

<223> Nucleotide sequence coding for IRF-2 protein

<400> 6

aactgacggg ctttcatttc catttcacac accctagcaa cacttatacc ttgcggaatt 60

gtattggtag cgtgaaaaaa gcacactgag agggcaccat gccggtggaa aggatgcgca 120

tgcgcccgtg gctggaggag cagataaact ccaacacgat cccggggctc aagtggctta 180

acaaggaaaa gaagatTTTT cagatcccct ggatgcatgc ggctagacat gggTgggatg 240
 tggaaaaaga tgcaccactc tttagaaacc gggcaatcca tacaggaaag catcaaccag 300
 gagtagataa acctgatccc aaaacatgga aggcgaattt cagatgcgcc atgaattcct 360
 tgcctgatat tgaagaagtc aaggataaaa gcataaagaa aggaaataat gccttcaggg 420
 tctaccgaat gctgccccta tcagaacggc cttctaagaa aggaaagaaa ccaaagacag 480
 aaaaagaaga caaagttaag cacatcaagc aagaaccagt tgagtcatct ctggggctta 540
 gtaatggagt aagtgatctt tctcctgagt atgcggtcct gacttcaact ataaaaaatg 600
 aagtggatag tacggtgaac atcatagtTg taggacagtc ccatctggac agcaacattg 660
 agaatcaaga gattgtcacc aatccgccag acatttgcca agttgtagag gtgaccactg 720
 agagcgacga gcagccggtc agcatgagcg agctctaccc tctgcagatc tccccgtgt 780
 cttcctatgc agaaagcgaa acgactgata gtgtgcccag cgatgaagag agtgccgagg 840
 ggcggccaca ctggcggaag aggaatatTg aaggcaaaca gtacctcagc aacatgggga 900
 ctcgaggctc ctacctgctg cccggcatgg cgtccttcgt cacttccaac aaaccggacc 960
 tccaggtcac catcaaagag gagagcaatc cggTgcctta caacagctcc tggccccctt 1020
 ttcaagacct ccccccttct tcttccatga cccagcatc cagcagcagt cggccagacc 1080
 gggagacccg ggccagcgtc atcaagaaaa catcgatat caccaggcc cgcgtcaaga 1140
 gctgttaagc ctctgactct ccgcggtggt tgttggggct tcttggcttt gttttgttgt 1200
 ttgtttgtat tttatTTTT tctctctgac acctatttta gacaaatcta agggaaaaag 1260
 ccttgacaat agaacattga ttgctgtgtc caactccagt acctggagct tctctttaac 1320
 tcaggactcc agcccattgg tagacgtgtg tttctagagc ctgctggatc tcccagggt 1380
 actcactcaa gttcaaggac caacaagggc agtggaggTg ctgcattgcc tgcggtcaag 1440
 gccagcaagg tggagtggat gcctcagaac ggacgagata atgtgaacta gctggaattt 1500
 tttattcttg tgaatatgta cataggcagc actagcgaca ttgcagtctg cttctgcacc 1560
 ttatcttaaa gcacttacag ataggccttc ttgtgatctt gctctatctc acagcacact 1620
 cagcaccccc ttctctgccc attccccagc ctctcttcct atcccatccc atcccatccc 1680
 atcccatccc atcccatccc gctcttttcc tacttttcc tccctcaaag ctcccatcc 1740
 acatccggag gagaagaagg aaatgaattt ctctacagat gtcccatTTT cagactgctt 1800
 taaaaaaaat ctttctaate tgctatgctt gaatgccacg cgttaciaag gaaaaagtat 1860
 catggaaata ttatgcaaat tcccagattt gaagacaaaa atactctaata tctaaccaga 1920

gcaagctttt ttatttttta tacaggggaa tattttattc aaggtaaaat tctaaataaa 1980
 atataattgt tttttatctt ttctacagca aatttataat ttttaagattc cttttcttgt 2040
 ttatcagcag ttgttattac atccttgtgg cacatttttt ttttaatttg taaagggtgaa 2100
 aaaagctttt atgagctcat ctagcaatca gattttcctg tgga 2144

【 0 1 1 5 】

< 2 1 0 > 7

< 2 1 1 > 349

< 2 1 2 > PRT

< 2 1 3 > Homosapiens

< 2 2 3 > Amino acid sequence of IRF-2 protein

< 4 0 0 > 7

Met Pro Val Glu Arg Met Arg Met Arg Pro Trp Leu Glu Glu Gln Ile

1 5 10 15

Asn Ser Asn Thr Ile Pro Gly Leu Lys Trp Leu Asn Lys Glu Lys Lys

20 25 30

Ile Phe Gln Ile Pro Trp Met His Ala Ala Arg His Gly Trp Asp Val

35 40 45

Glu Lys Asp Ala Pro Leu Phe Arg Asn Arg Ala Ile His Thr Gly Lys

50 55 60

His Gln Pro Gly Val Asp Lys Pro Asp Pro Lys Thr Trp Lys Ala Asn

65 70 75 80

Phe Arg Cys Ala Met Asn Ser Leu Pro Asp Ile Glu Glu Val Lys Asp

85 90 95

Lys Ser Ile Lys Lys Gly Asn Asn Ala Phe Arg Val Tyr Arg Met Leu

100 105 110

Pro Leu Ser Glu Arg Pro Ser Lys Lys Gly Lys Lys Pro Lys Thr Glu

115 120 125

Lys Glu Asp Lys Val Lys His Ile Lys Gln Glu Pro Val Glu Ser Ser

130 135 140

Leu Gly Leu Ser Asn Gly Val Ser Asp Leu Ser Pro Glu Tyr Ala Val
145 150 155 160

Leu Thr Ser Thr Ile Lys Asn Glu Val Asp Ser Thr Val Asn Ile Ile
165 170 175

Val Val Gly Gln Ser His Leu Asp Ser Asn Ile Glu Asn Gln Glu Ile
180 185 190

Val Thr Asn Pro Pro Asp Ile Cys Gln Val Val Glu Val Thr Thr Glu
195 200 205

Ser Asp Glu Gln Pro Val Ser Met Ser Glu Leu Tyr Pro Leu Gln Ile
210 215 220

Ser Pro Val Ser Ser Tyr Ala Glu Ser Glu Thr Thr Asp Ser Val Pro
225 230 235 240

Ser Asp Glu Glu Ser Ala Glu Gly Arg Pro His Trp Arg Lys Arg Asn
245 250 255

Ile Glu Gly Lys Gln Tyr Leu Ser Asn Met Gly Thr Arg Gly Ser Tyr
260 265 270

Leu Leu Pro Gly Met Ala Ser Phe Val Thr Ser Asn Lys Pro Asp Leu
275 280 285

Gln Val Thr Ile Lys Glu Glu Ser Asn Pro Val Pro Tyr Asn Ser Ser
290 295 300

Trp Pro Pro Phe Gln Asp Leu Pro Leu Ser Ser Ser Met Thr Pro Ala
305 310 315 320

Ser Ser Ser Ser Arg Pro Asp Arg Glu Thr Arg Ala Ser Val Ile Lys
325 330 335

Lys Thr Ser Asp Ile Thr Gln Ala Arg Val Lys Ser Cys
340 345

【 0 1 1 6 】

< 2 1 0 > 8

< 2 1 1 > 9

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 > IFN-gamma activated siile (GAS) consensus Sequence

< 4 0 0 > 8

ttncnnnaa

9

【 0 1 1 7 】

< 2 1 0 > 9

< 2 1 1 > 13

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 > IFN-alpha stimulated response element (ISRE) consensus Sequence

< 4 0 0 > 9

ngaaanngaa act

13

【 0 1 1 8 】

< 2 1 0 > 10

< 2 1 1 > 9

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 >

< 4 0 0 > 10

ttcccagaa

9

【 0 1 1 9 】

< 2 1 0 > 11

< 2 1 1 > 13

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 >

< 4 0 0 > 11

ggaaactgaa act

13

【 0 1 2 0 】

< 2 1 0 > 12

< 2 1 1 > 29

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 > ISRE-F2 probe

< 4 0 0 > 12

aatttctggg aaactgaaae tgaaaacct

29

【 0 1 2 1 】

< 2 1 0 > 13

< 2 1 1 > 29

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 > ISRE-F2 probe

< 4 0 0 > 13

aattaggttt tcagtttcag tttcccaga

29

【 0 1 2 2 】

< 2 1 0 > 14

< 2 1 1 > 37

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 > adp-1 probe

< 4 0 0 > 14

catggcatct acttcgtatg actattgcag agtgcc

37

【 0 1 2 3 】

< 2 1 0 > 15

< 2 1 1 > 36

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 > adp-2 probe

< 4 0 0 > 15

catgggcact ctgcaatagt catacgaagt agatgc

36

【 0 1 2 4 】

< 2 1 0 > 16

< 2 1 1 > 29

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 > Primer HM2k

< 4 0 0 > 16

aaaggtacca gctgtctttc tgtctgtcc

29

【 0 1 2 5 】

< 2 1 0 > 17

< 2 1 1 > 28

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 > BST2B

< 4 0 0 > 17

atagtcatac gaagtagatg ccatccag

28

【 0 1 2 6 】

< 2 1 0 > 18

< 2 1 1 > 28

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 1 >

< 2 2 2 >

<2 2 3> Primer 10S

<4 0 0> 18

tttcggtacc taattaatcc tctgcctg

28

【0 1 2 7】

<2 1 0> 19

<2 1 1> 23

<2 1 2> DNA

<2 1 3> Artificial Sequence

<2 2 0>

<2 2 1>

<2 2 2>

<2 2 3> GL Primer 2

<4 0 0> 19

ctttatgttt ttggcgtcctt cca

23

【0 1 2 8】

<2 1 0> 20

<2 1 1> 30

<2 1 2> DNA

<2 1 3> Artificial Sequence

<2 2 0>

<2 2 1>

<2 2 2>

<2 2 3> Primer HMP700

<4 0 0> 20

aaaggtacca gagtttacct ggtatcctgg

30

【0 1 2 9】

<2 1 0> 21

<2 1 1> 39

<2 1 2> DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 > Primer 11A'

< 4 0 0 > 21

cagaggatta attaggtacc gaaagagagg tgggctttt

39

【 0 1 3 0 】

< 2 1 0 > 22

< 2 1 1 > 24

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 > Primer IRF2-F2

< 4 0 0 > 22

ttgtatttgt agcgtgaaaa aagc

24

【 0 1 3 1 】

< 2 1 0 > 23

< 2 1 1 > 24

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 > Primer IRF2-R2

< 4 0 0 > 23

cagctagttc acattatctc gtcc

24

【0132】

<210> 24

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223> Primer IRF2-F1

<400> 24

agagggtacc atgccggtgg aaaggatgcg

30

【0133】

<210> 25

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223> Primer IRF2-R1

<400> 25

agtcggtacc ttaactgctc ttgacgcggg

30

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、インターフェロン α の非存在下（上）は存在下（下）で培養した骨髓腫細胞株U266を、標識としてヒトIgG(対照)又は抗HM1.24抗体を用いてフローサイトメトリーにより分析した結果を示す。

【図2】

図2は、インターフェロン α の非存在下（上）又は存在下（下）で培養した患

者骨髓腫細胞を、標識としてヒトIgG(対照)又は抗HM1.24抗体を用いてフローサイトメトリーにより分析した結果を示す。

【図 3】

図 3 は、HM1.24抗原をコードする遺伝子のプロモーター領域を挿入したレポータープラスミドにより形質転換したU266細胞をインターフェロン α の非存在下又は種々の濃度での存在下で培養した後ルシフェラーゼ活性を測定した結果を示すグラフである。

【図 4】

図 4 は、HM1.24抗原をコードする遺伝子のプロモーター領域の内、転写開始点から 1 5 1 bp上流まで、又は 7 7 bp上流までを挿入したレポータープラスミドにより形質転換されたU266細胞又はHEL 細胞を、インターフェロン α (1000 U/■l) の存在下で培養した後にルシフェラーゼ活性を測定した結果を示すグラフである。

【図 5】

図 5 は、インターフェロン γ の非存在下(上)は存在下(下)で培養した骨髓腫細胞株U266を、標識としてヒトIgG(対照)又は抗HM1.24抗体を用いてフローサイトメトリーにより分析した結果を示す。

【図 6】

図 6 は、インターフェロン γ の非存在下(上)又は存在下(下)で培養した患者骨髓腫細胞を、標識としてヒトIgG(対照)又は抗HM1.24抗体を用いてフローサイトメトリーにより分析した結果を示す。

【図 7】

図 7 は、U266培養細胞にIFN- α を添加することにより産生されHM1.24プロモーター領域に結合する転写因子の量の経時的变化を示す電気泳動図であり、図面代用写真である。NE(-)は核抽出物添加せず。0 hはIFN- α 刺激なしの核抽出物を添加。0.5 ~ 8 hはIFN- α (1000 U/■l) 刺激後それぞれの時間経過した核抽出物を添加。+cold は未標識ISRE2 プローブ50ng添加、+cold unrelated は未標識adp 配列50ng添加。

【図 8】

図 8 は、HM1.24プロモーターに結合する転写因子を、各種の抗体を用いて同定した結果を示す電気泳動図であり、図面代用写真である。NE(-) は核抽出物添加せず。0 h はIFN- α 刺激なしの核抽出物を添加。8 h はIFN- α (1000 U/ml) 刺激後 8 h の核抽出物を添加。+cold は未標識ISRE2 プローブ50ng添加。+cold unrelated は未標識adp 配列50ng添加。抗体はそれぞれ2 μ g 添加。

【図 9】

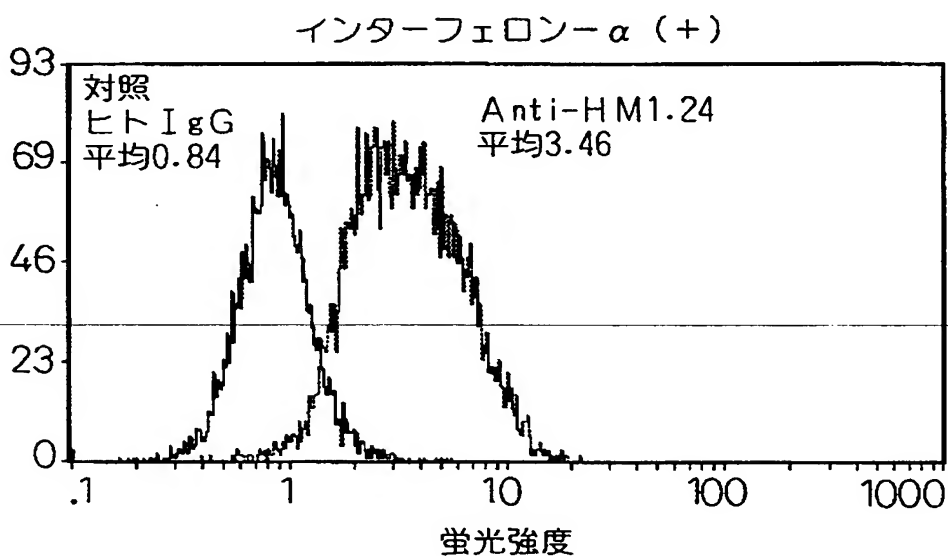
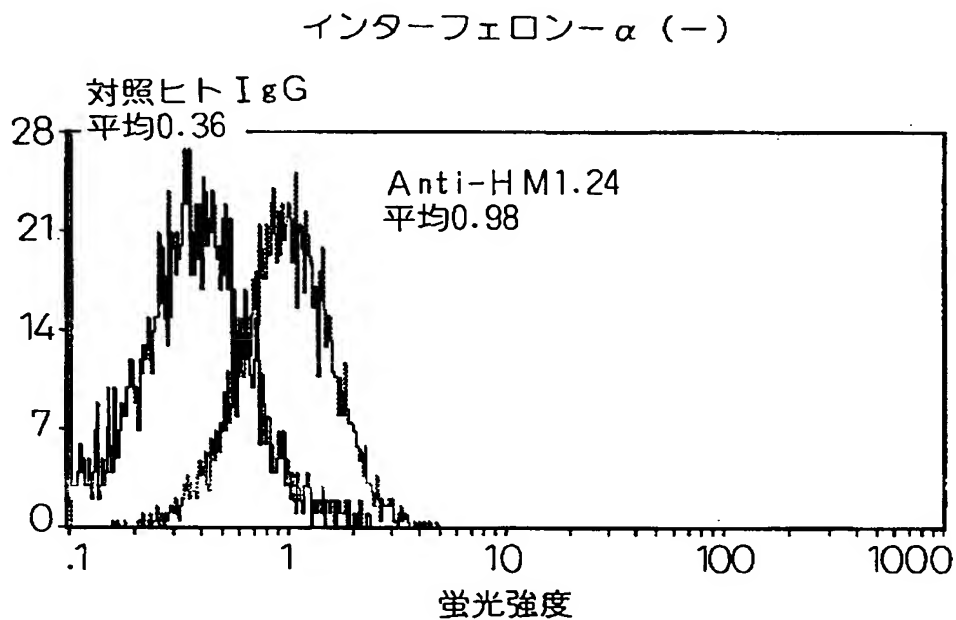
図 9 は、HM1.24プロモーターレポータープラスミドとIRF-2 発現プラスミドとをU266細胞に導入し、レポーター活性を測定した場合の結果を示すグラフである。

【書類名】

図面

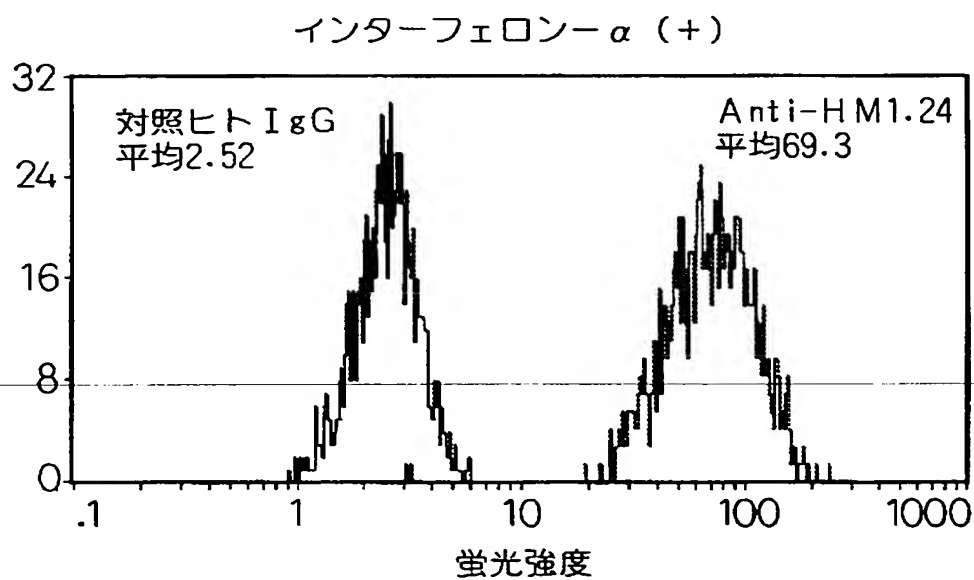
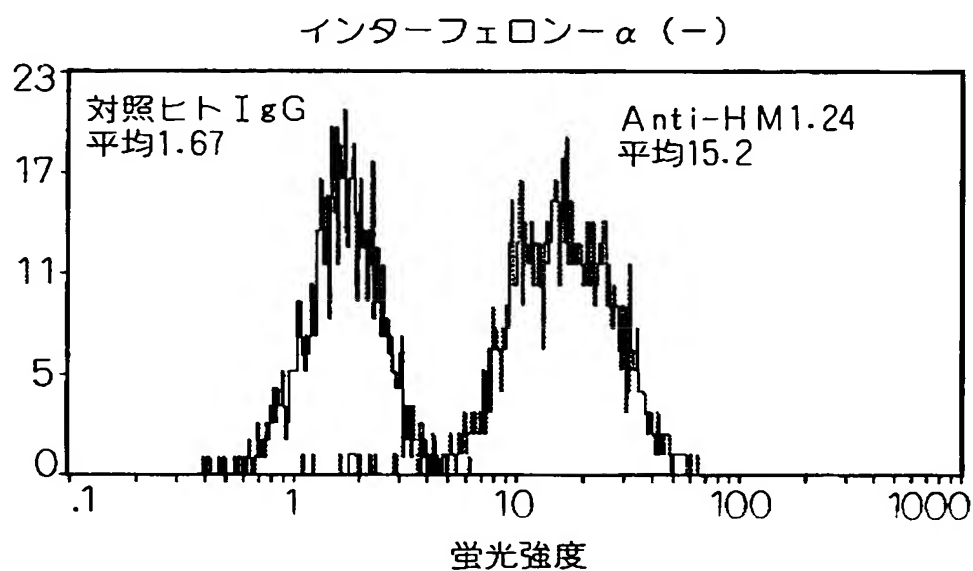
【図1】

図 1



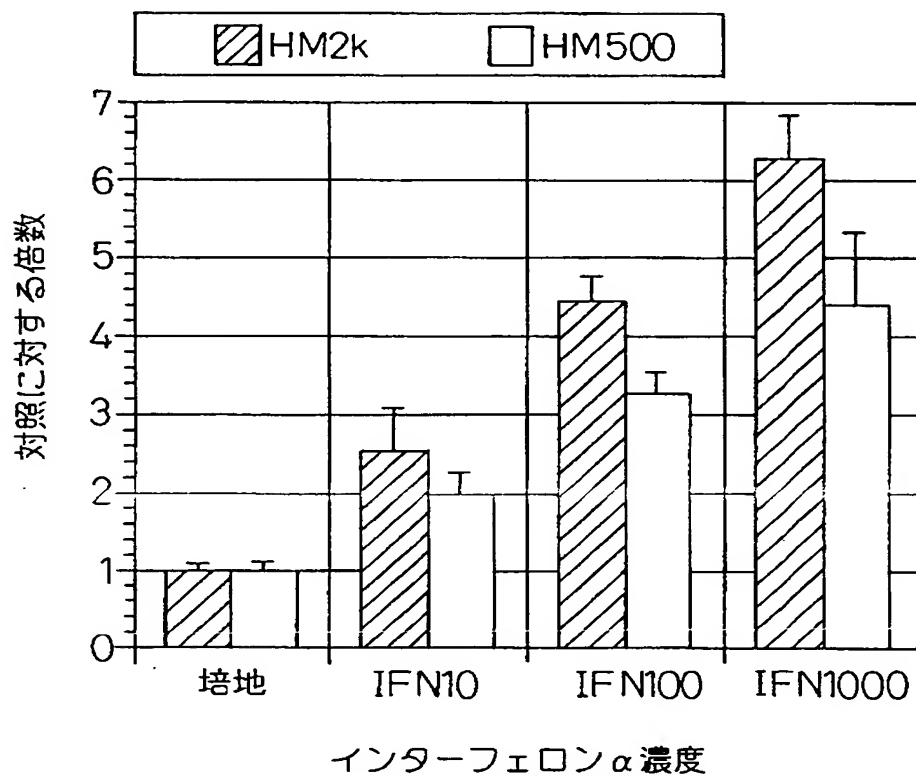
【図2】

図 2



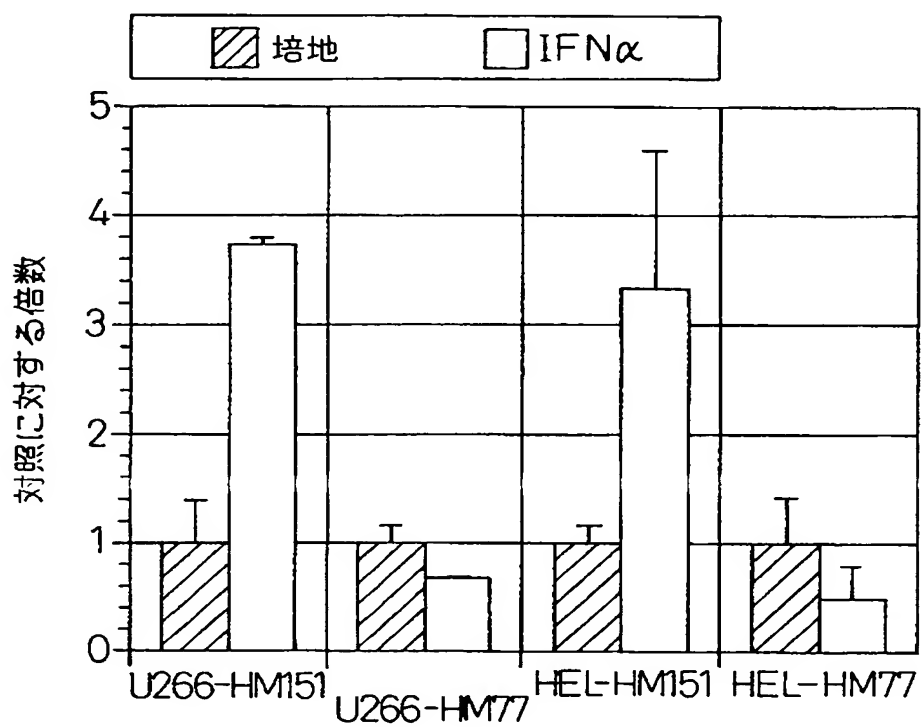
【図3】

図 3



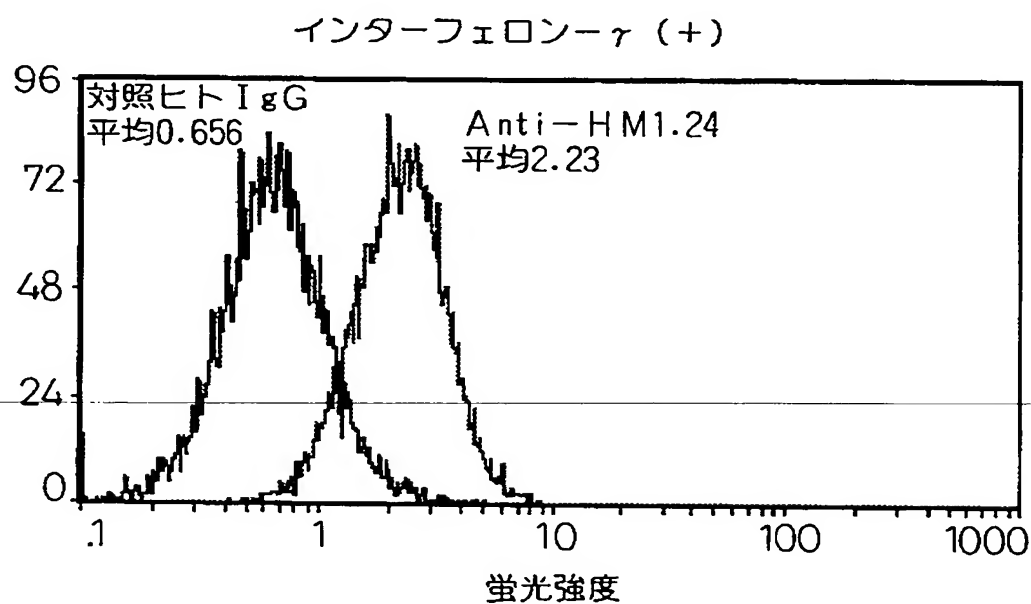
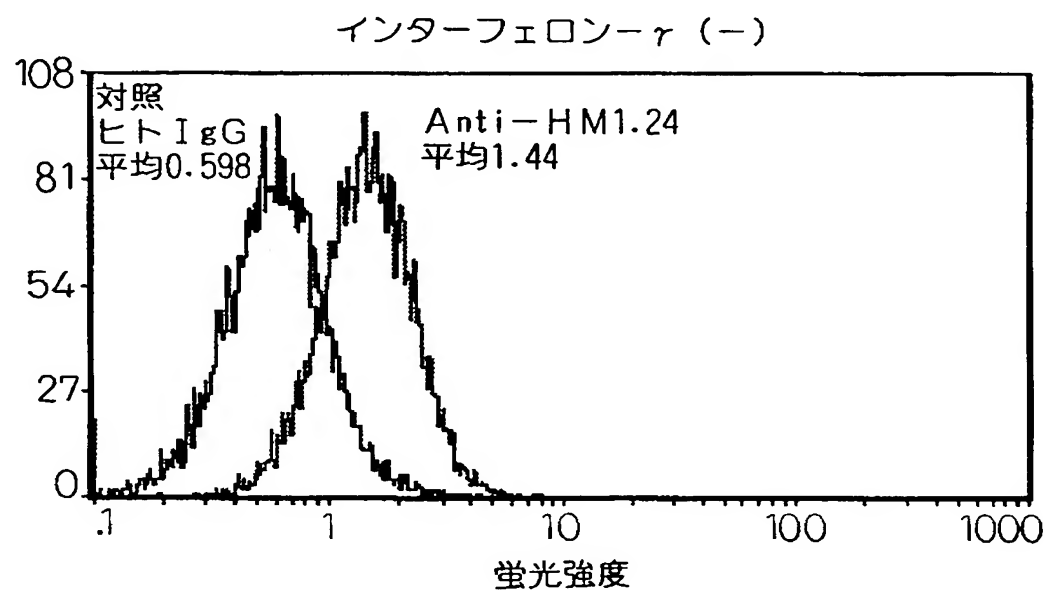
【図4】

図 4



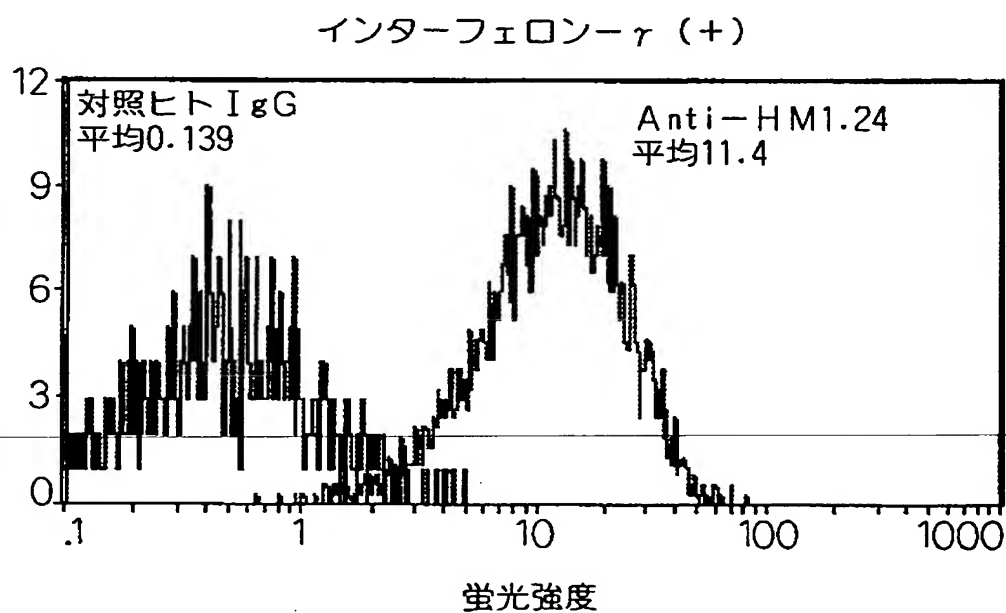
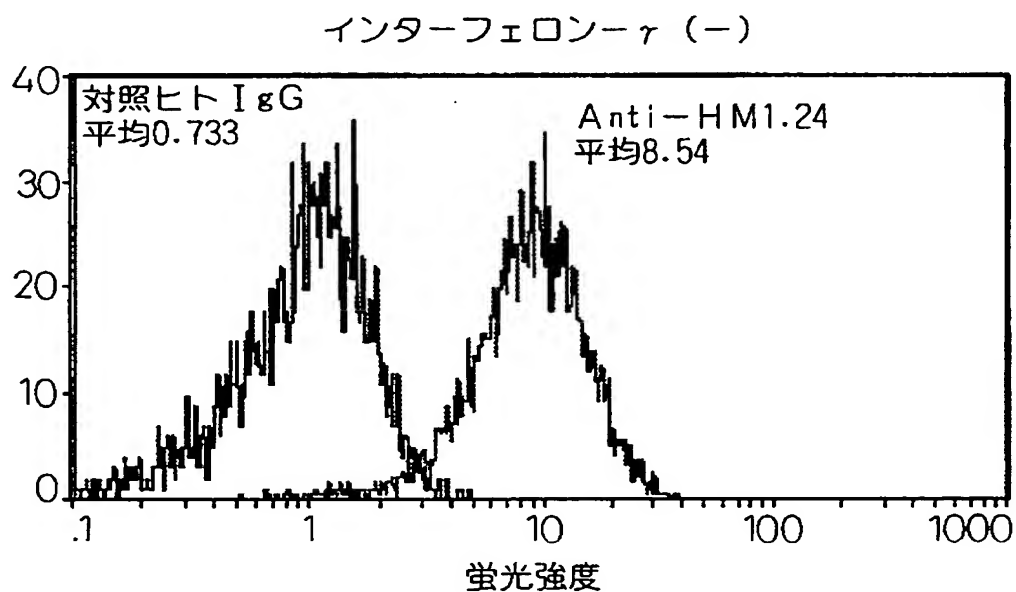
【図5】

図5



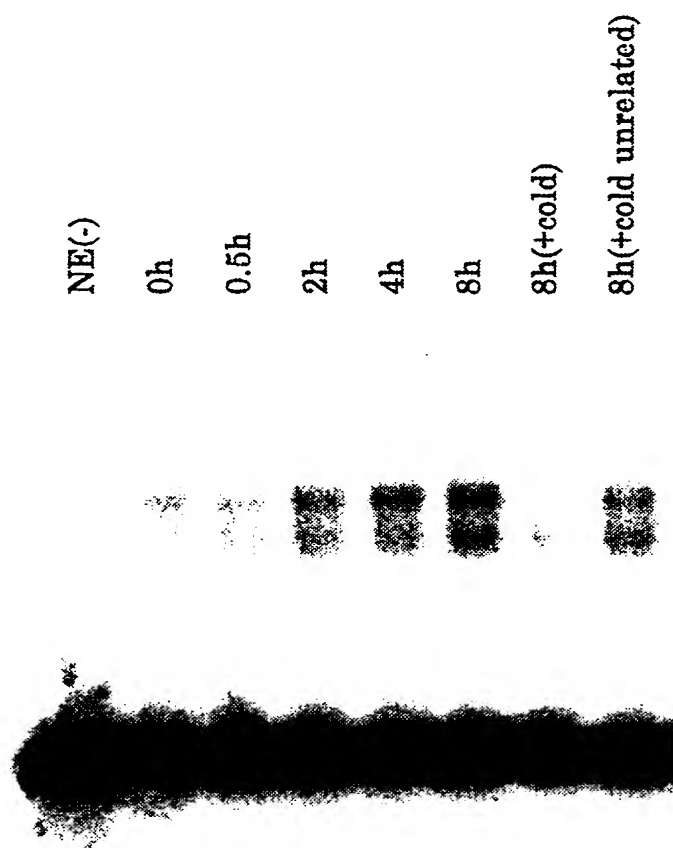
【図6】

図 6



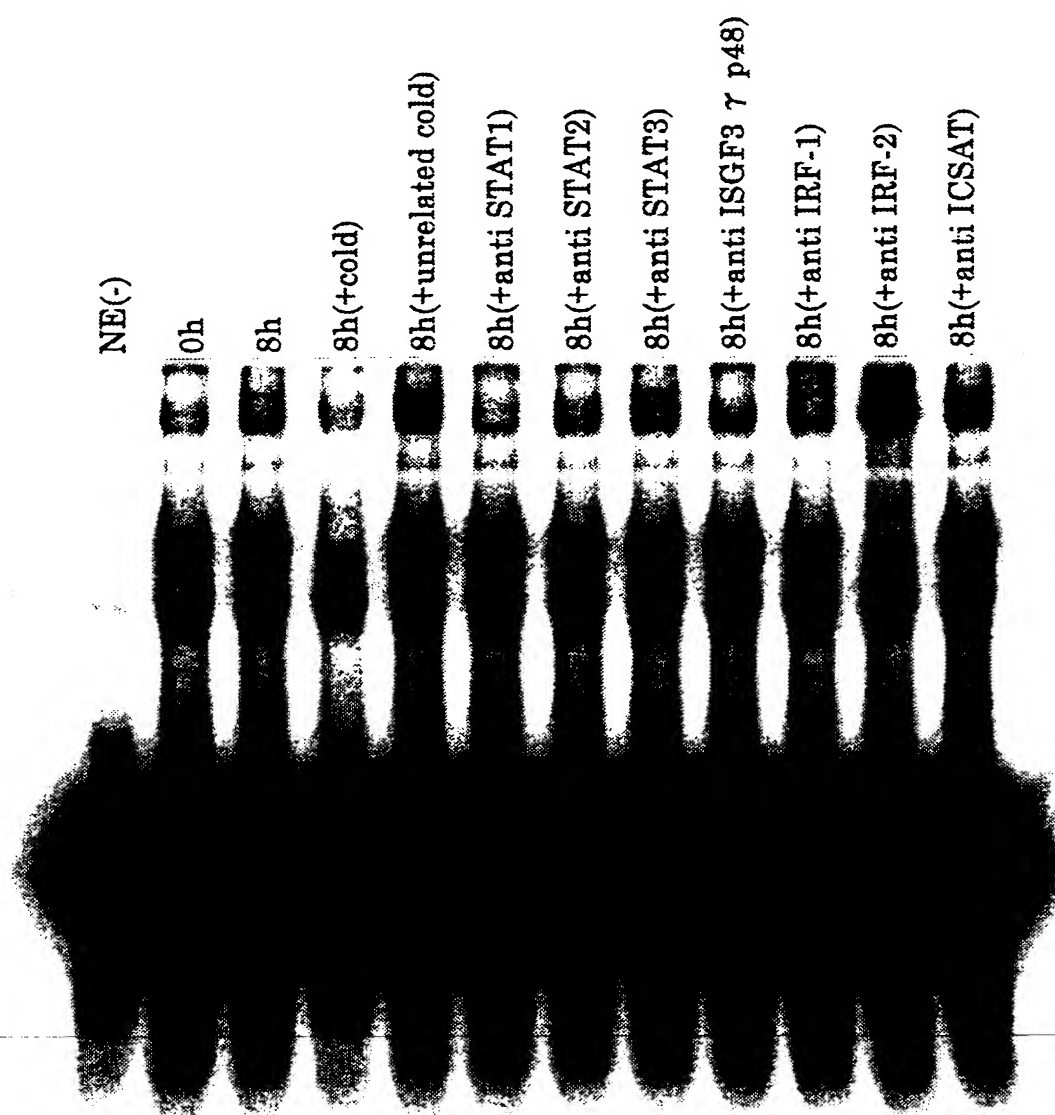
【図 7】

図 7



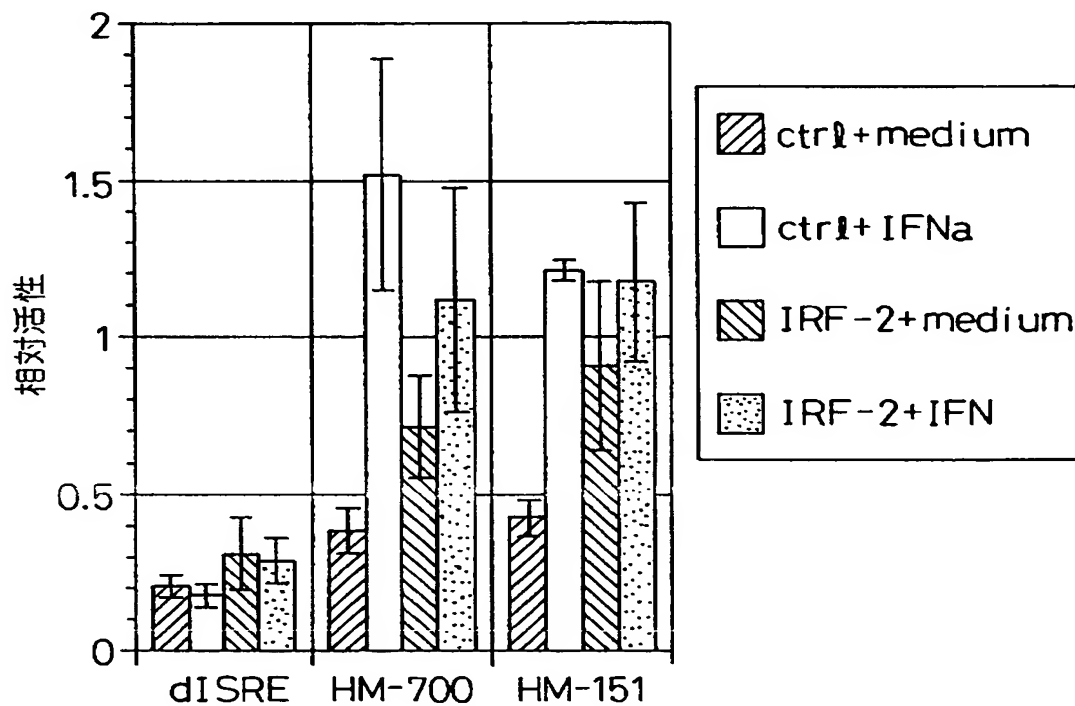
【図 8】

図 8



【図9】

図 9



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 抗癌性を有する抗HM1.24抗体の標的としてのHM1.24癌抗原の発現を増強する新規な手段の提供。

【解決手段】 インターフェロン α もしくはインターフェロン γ 又は IRF-2蛋白質を有効成分とする、骨髄腫細胞におけるHM1.24抗原の発現増強剤。インターフェロン α および γ は、HM1.24抗原をコードする遺伝子のプロモーターの活性化を介して、HM1.24抗原の発現を増強すると予想される。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2000-038689
受付番号	50000174971
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成12年 2月21日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000003311

【住所又は居所】 東京都北区浮間5丁目5番1号

【氏名又は名称】 中外製薬株式会社

【代理人】 申請人

【識別番号】 100077517

【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所

【氏名又は名称】 石田 敬

【選任した代理人】

【識別番号】 100092624

【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所

【氏名又は名称】 鶴田 準一

【選任した代理人】

【識別番号】 100087871

【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所

【氏名又は名称】 福本 積

【選任した代理人】

【識別番号】 100082898

【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所

【氏名又は名称】 西山 雅也

【選任した代理人】

【識別番号】 100081330

【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所

次頁有

認定・付加情報（続き）

【氏名又は名称】 樋口 外治

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000003311]

1. 変更年月日 1990年 9月 5日
[変更理由] 新規登録
住 所 東京都北区浮間5丁目5番1号
氏 名 中外製薬株式会社